

Aus dem Klinisch-Chemischen Labor (Leiter: Prof. Dr. T. O. Kleine)
der Universitäts-Nervenlinik, Marburg/Lahn
(Direktor: Prof. Dr. H. Jacob)

**DER EINFLUSS VON ANTI-PROTEOGLYCAN-SEREN UND VON
HYALURONIDASEABBAU DER EXTRACELLULARSUBSTANZ AUF DIE
BIOSYNTHESE VON CHONDROITINSULFATPROTEIN,
GESAMTPROTEIN UND ANAEROBE GLYCOLYSE IM KÄLBERRIPPENKNORPEL
IN VITRO**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde

des Fachbereiches Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

MONIKA WUNSCH

aus Oberkochen

Marburg 1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552328_0081

Aus dem Klinisch-Chemischen Labor (Leiter: Prof.Dr.T.O.Kleine)
der Universitäts-Nervenlinik, Marburg/Lahn
(Direktor: Prof.Dr.H.Jacob)

DER EINFLUSS VON ANTI-PROTEOGLYCAN-SEREN UND VON HYALURONIDASE-
ABBAU DER EXTRACELLULARSUBSTANZ AUF DIE BIOSYNTHESE VON CHON-
DROITINSULFATPROTEIN, GESAMTPROTEIN UND ANAEROBE GLYCOLYSE IM
KÄLBERRIPPENKNORPEL IN VITRO

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde

des Fachbereiches Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

MONIKA WUNSCH
aus Oberkochen

Marburg 1976

Diese Untersuchung wurde durch eine Sachbeihilfe der
Deutschen Forschungsgemeinschaft (Kl 193/9) ermöglicht.



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am 26.3.1976

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. Oepen

Referent: Prof. Dr. T.O. Kleine

Correferent: Prof. Dr. Schachtschabel

Inhaltsverzeichnis

Seite

1.	Einleitung	1
2.	Methodik	2
2.1.	Präparation von Antigenen	2
2.2.	Präparation von Antiseren bzw. Kontrollseren	2
2.3.	Geldiffusion nach Ouchterlony	3
2.4.	Zubereitung der Knorpelschnitte	4
2.5.	Inkubationsversuche in der Warburg-Apparatur	4
2.5.1.	Zusammensetzung des Mediums	4
2.5.2.	Radioaktiv markierte Vorstufen der Chondroitinsulfatproteinsynthese	5
2.5.3.	Versuchsablauf mit Antiseren bzw. Kontrollseren	5
2.5.3.1.	Versuchsablauf mit Hyaluronidase	6
2.5.4.	Manometrische Messung der CO ₂ -Bildung	6
2.6.	Aufarbeitung der inkubierten Knorpelschnitte	7
2.6.1.	Isolierung der Chondroitinsulfatpeptide	8
2.6.2.	Reinigung der Chondroitinsulfatpeptide	8
2.6.3.	Isolierung und Messung der Desoxyribo- nucleinsäure (DNS) in Knorpelschnitten	9
2.6.4.	Isolierung des Gesamtproteins	10
2.7.	Bausteinanalysen	10
2.7.1.	Bestimmung von Glucuronsäure mittels der Carbazol-Reaktion	10
2.7.2.	Bestimmung von Aminosackern mittels der Elson-Morgan-Reaktion	11
2.7.3.	Bestimmung von Sulfatestern mittels der Benzidin-Reaktion	12
2.7.4.	Bestimmung des Gesamtproteins mittels der Biuret-Reaktion	14
2.7.5.	Bestimmung von Serin und Leucin im Chondroitinsulfatpeptid	14

	Seite
2.8.	Messung der Radioaktivität 15
2.8.1.	von alkalischen Proben 15
2.8.2.	von wäßrigen neutralen Proben 15
2.9.	Statistische Berechnungen 16
3.	E r g e b n i s s e 17
3.1.	Charakterisierung der Antiseren 17
3.2.	Die Zusammensetzung des Kälberrippenknorpels 19
3.3.	Der Einfluß von Anti-Proteoglycan-Seren auf die Biosynthese von Chondroitinsulfatproteinen und Gesamtprotein im Kälberrippenknorpel in vitro 22
3.3.1.	Anti-Proteoglycansubunit(PGS)-Serum 22
3.3.2.	Antiserum gegen reines Chondroitinsulfatprotein (CSP) 32
3.3.3.	Antiserum gegen rohes Chondroitinsulfatprotein (CSP) 36
3.3.3.1.	Absättigungsversuche 40
3.3.4.	Der Einfluß von Anti-Proteoglycan-Seren auf die anaerobe Glycolyse von Kälberknorpelzellen in vitro 40
3.3.5.	Der Einfluß von Antiserum auf Carbazol-positives Material im Inkubationsmedium 42
3.4.	Der Einfluß von Hyaluronidase-Behandlung auf die Biosynthese von Chondroitinsulfatprotein und Gesamtprotein im Kälberrippenknorpel in vitro 42
3.4.1.	Der Einfluß von Hyaluronidasebehandlung auf die anaerobe Glycolyserate in Knorpelzellen in vitro 47
3.4.2.	Der Einfluß von Hyaluronidasebehandlung auf den Gehalt an Carbazol-positivem Material im Medium 47
4.	D i s k u s s i o n 50
4.1.	Der Einfluß von Anti-Proteoglycan-Seren auf die Biosynthese von Chondroitinsulfatprotein, Gesamtprotein und anaerobe Glycolyse in Kälberrippenknorpel in vitro 50

4.2.	Der Einfluß von Hyaluronidaseabbau der Knorpelgrundsubstanz mittels Hyaluronidase auf die Biosynthese von Chondroitinsulfatprotein, Gesamt- protein und anaerobe Glycolyse in Kälberrippenknorpel in vitro	53
5.	Z u s a m m e n f a s s u n g	55
6.	L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s	57

Abkürzungen:

CSP	= Chondroitinsulfatprotein
PGS	= Proteoglycansubunit (=Proteoglycanuntereinheit nach der Definition von V.C.Hascall u. S.W. Sajdera, J.biol.chem. <u>244</u> , 2384 (1969))
CPC	= Cetylpyridiniumchlorid
Glc.S.	= Glucuronsäure
Hex-NH ₂	= Hexosamin

1. E i n l e i t u n g

Im Tierexperiment lassen sich durch Antikörper gegen Chondroitinsulfatprotein Arthritiden erzeugen (7, 9, 4). Obwohl sich bis jetzt bei der rheumatischen Arthritis des Menschen keine präzipitierenden humoralen Antikörper nachweisen lassen (11), wohl aber zellständige Antikörper (11), soll hier versucht werden zu untersuchen, ob Antiseren gegen verschieden stark gereinigte Chondroitinsulfatproteine eine Wirkung auf die Chondroitinsulfatproteinbiosynthese entfalten. Für diese Untersuchungen wurden ein semi- in- vitro- System aus dünnen Schnitten von Kälberrippenknorpel gewählt, das unter anaeroben Bedingungen zum überwiegenden Teil Chondroitinsulfatproteine synthetisiert (13, 14), sowie verschiedene Antiseren von Kaninchen, die mit unterschiedlich gereinigten Chondroitinsulfatproteinen immunisiert worden waren. Teile dieser Versuche sind bereits veröffentlicht worden (15, 16).

2. Methodik

2.1. Präparation von Antigenen

Chondroitinsulfatprotein wurde aus Kälberrippen mittels zweier verschiedener Extraktionstechniken isoliert:

- a) disruptive Extraktion mittels Bühler-Homogenisator (Fa. Bühler, Tübingen) und Äthanol-Kaliumacetat-Fällung des Produktes (KLEINE u. HILZ, 13): rohes Chondroitinsulfatprotein (CSP), das anschließend mittels Cetylpyridinium-Cellulose-Chromatographie weiter gereinigt wurde: reines Chondroitinsulfatprotein (CSP).
- b) dissoziative Extraktion mittels 4 M Guanidiniumchlorid und anschließender CsCl-Dichtegradientenzentrifugation ergab die Proteoglykan-Subunit (PGS), die mittels Cetylpyridinium-Cellulose-Chromatographie weiter gereinigt wurde (17).

2.2. Präparation von Antiseren bzw. Kontrollseren

Antiseren gegen rohes und reines CSP sowie gegen PGS wurden von Kaninchen (2,8 kg) gewonnen, denen 10 bis 20 mg jeder Substanz, gelöst in 1 ml 0,15 M NaCl und gemischt mit 2 ml Freund'schem komplettem Adjuvans (Fa. Behringwerke, Marburg), subcutan in die Pfoten injiziert wurde. Die Tiere erhielten 4 Injektionen innerhalb 6 Wochen und wurden nach einer Boosterinjektion einen Monat später entblutet. Die Seren wurden mittels Zentrifugation bei 3000 Upm und 4°C gewonnen und bei -20°C bis zum Gebrauch eingefroren.

Die Seren von 12 unbehandelten Kaninchen dienten als Kontrollseren.

Zur Absorption spezifischer Antikörper wurden 4 ml Antiserum gegen rohes CSP mit 12 mg Antigen 2 h bei 37°C, sodann für 24 h im Eisbad inkubiert. Im abzentrifugierten (6000 Upm) klaren Überstand ließ sich weniger als 1 % des ursprünglichen Uronsäuregehaltes nachweisen sowie keine Präzipitationseigenschaften gegen CSP im Ouchterlonytest (s. 2.3.)

2.3. Geldiffusion nach Ouchterlony

Die Antikörper gegen rohes und reines CSP und gegen PGS wurden mittels des Geldoppeldiffusionstests nach Ouchterlony in Agar nachgewiesen und charakterisiert (KLEINE, 18). Zur Agarherstellung wurde 1 g Agarose (Fa. Behringwerke, Marburg) in 50 ml Aqua bidest. unter Kochen gelöst. Nach Abkühlen wurde die gleiche Menge 0,1 M Kaliumphosphatpuffer von pH 6,5 zugegeben, gemischt und mit Methiolate 1:1000 versetzt. In einer Immunelektrophorese-Apparatur der Firma LKB wurden die Objektträger mit 10 ml dieser Lösung beschickt. Nach einstündiger waagerechter Lagerung wurde die Agarschicht mittels Schablone gelocht. In jedes Loch wurden 5 µl Antiserum bzw. Testlösung gegeben. Die CSP wurden drei bis vier Stunden vor Zugabe des Antiserums eingebracht. Nach 10-tägiger Inkubation in einer feuchten Kammer bei 25°C wurden die Agarplatten mit physiologischer NaCl-Lösung, der Natriumacid (10 g/l) zugesetzt war, zwei Tage unter einmaligem Wechseln der Lösung gewässert. Danach wurde die Gelschicht mit Heißluft getrocknet, vier Stunden mit Amidoschwarz-B-Lösung (Fa. E. Merck, Darmstadt) gefärbt und zwei Stunden entfärbt mit einer Lösung, die 500 ml Eisessig in 4200 ml Methanol enthielt.

2.4. Zubereitung der Knorpelschnitte
(KLEINE et al., 14)

Rippenknorpel von drei bis vier Monate alten Kälbern wurde etwa 5 bis 24 h nach dem Töten der Tiere (in der Zwischenzeit auf Eis aufbewahrt) bei 4°C im Kühlraum von Perichondrium und Bindegewebe befreit und mit einem Mikrotom (Fa. Jung, Heidelberg) in 50 bis 100 µ dicke Scheiben geschnitten, die in einer Petrischale auf mit Medium (s. 2.5.1.) durchtränktem Filterpapier über Eis aufbewahrt wurden.

2.5. Inkubationsversuche in der Warburg-Apparatur

Es wurde Modell V 85 der Fa. B. Braun, Melsungen, bei einer Schüttelfrequenz von 75 pro min verwendet. Unter obigen Versuchsbedingungen wurden eingesetzt:

- A) 0,3 ml Antiserum und 2,7 ml Medium,
- B) 0,8 ml Antiserum und 2,2 ml Medium,
- C) 4 ml Medium sowie jeweils 0,3 g Knorpelschnitte.

2.5.1. Zusammensetzung des Mediums aus drei Grundlösungen

Grundlösung 1 enthielt in 1000 ml Aqua bidest. gelöst
57,04 g NaCl p.A., 1,60 g KH_2PO_4 p.A.,
3,50 g KCl p.A., 2,20 $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ p.A.,
50,00 ml 0,1 N H_2SO_4 p.A.
und wurde mit 2 N NaOH auf pH 7,2 eingestellt.

Grundlösung 2: 8,4 g NaHCO_3 p.A. in 250 ml Aqua bidest.
gelöst.

Grundlösung 3: 11,5 g Glucose $\cdot \text{H}_2\text{O}$ in 250 ml Aqua bidest.
gelöst.

Das Medium enthielt 50 ml Grundlösung 1, 25 ml Grundlösung 2
und 25 ml Grundlösung 3 in 500 ml Aqua bidest.

2.5.2. Radioaktiv markierte Vorstufen der
Chondroitinsulfatproteinsynthese

$\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4^{2-}$ trägerfrei der Fa. Buchler, Braunschweig;

pro Ansatz: 20 μCi in 0,1 ml Medium gelöst.

D-Glucosamin-6- $^3\text{H}(\text{N})$; spezifische Aktivität:

7,3 Ci/mMol; pro Ansatz: 10 μCi in 0,1 ml Medium gelöst.

L-Serin- $^{14}\text{C}(\text{U})$; spezifische Aktivität: 156 mCi/mMol bzw.

128 mCi/mMol; pro Ansatz: 1 μCi bzw. 5 μCi in 0,1 ml
Medium gelöst.

L-Leucin-4,5- $^3\text{H}(\text{N})$; spezifische Aktivität: 31,9 mCi/mMol;
pro Ansatz: 20 μCi bzw. 16,4 μCi in 0,1 ml Medium gelöst.

Die Substanzen wurden von der Fa. NEN, Dreieichenhain bei
Frankfurt, bezogen.

2.5.3. Versuchsablauf mit Antiserum bzw. Kontrollserum

Die im Eisbad angesetzten Warburg-Gefäße mit Schnitten,
Medium, Kontroll- bzw. Antiserum sowie radioaktiven Pre-
cursorern (im Seitenarm) (Doppelmarkierungsversuche) wurden
wie folgt behandelt:

- a) Vorinkubation bei 1°C für 1,5 bzw. 4,5 h, sodann 1,5 h
Inkubation bei 37°C im Warburg-Apparat mit radioaktiven
Vorstufen (Bedingungen für 2.5.A) oder
- b) Vorinkubation bei 37°C im Warburg-Apparat für 1 h, 2 h
bzw. 4 h, sodann 1,5 h Inkubation (mit den radioaktiven
Vorstufen (2.5.2., (Bedingungen für 2.5.B)). Im Warburg-
Apparat wurde jedes Gefäß 15 min mit einem Gemisch aus
95 % N_2 und 5 % CO_2 begast, nach Äquilibration erfolgten
die manometrischen Druckmessungen.

2.5.3.1. Versuchsablauf mit Hyaluronidase

(Bedingungen 2.5.C)

Es wurde mit Hyaluronidase (EC 4.2.99.1) aus Schafstestes (500 E/mg) in einer Konzentration von 10 mg/ml für 20, 70 und 140 min bei 37°C vorinkubiert und mit radioaktiven Vorstufen (s. 2.5.2., Doppelmarkierung) für 90 min inkubiert.

2.5.4. Manometrische Messungen der CO₂-Bildung

(UMBREIT et al., 26)

Die entwickelte CO₂-Menge wurde nach folgender Formel errechnet:

$$x = k \cdot h$$

wobei:

x = entwickelte CO₂-Menge in µl, bezogen auf Normalbedingungen (760 mm Hg, 0°C).

k = Gefäßkonstante, die alle dem Reaktionssystem (Manometer und Gefäß) und den Versuchsbedingungen zugeordneten Faktoren umfaßt, die während des Versuchs unverändert bleiben.

h = manometrische Differenz in mm, korrigiert mit der Druckdifferenz des Thermobarometers.

Die Gefäßkonstante k errechnet sich nach folgender Formel:

$$k = \frac{Vg \frac{273}{T} + Vf \cdot \alpha}{Po}$$

wobei:

Vg = gesamtes Volumen im Reaktionsgefäß, zuzüglich des Volumens der Manometerkapillaren bei Ausgangsstellung 150, abzüglich des Volumens der eingefüllten Flüssigkeits- und Knorpelmenge.

T = absolute Temperatur des Reaktionssystems in $^{\circ}\text{K}$, d.h. bei meinen Versuchen die Temperatur des Wasserbades von 37°C , umgerechnet in $^{\circ}\text{K} = 273^{\circ}\text{C} + 37^{\circ}\text{C}$.

Vf = Volumen der in das Reaktionsgefäß eingefüllten Probenmengen in μl (z.B. $4300 \mu\text{l}$).

α = Bunsenscher Absorptionskoeffizient, der die Löslichkeit von Kohlendioxyd in der Flüssigkeit im Reaktionsgefäß bei 760 mm Hg, bezogen auf eine bestimmte Temperatur, angibt. Bei 37°C beträgt er 0,567.

p₀ = Normaldruck = 10.000 mm einer Brodie-Lösung (= Manometersperrflüssigkeit).

Die gebildete CO_2 -Menge in μl wurde mit Hilfe des Molvolumens gasförmiger Stoffe auf $\mu\text{Mol CO}_2$ pro Stunde und pro g Feuchtgewicht berechnet. Sie ist ein Maß für die anaerobe Glykolyse rate der Knorpelschnitte.

2.6. Aufarbeitung der inkubierten Knorpelschnitte (KLEINE et al., 13, 14)

Nach Inkubationsende wurden die Gefäße sofort auf Eis gestellt, und nach Entnahme von etwa 1 ml Medium pro Glas für die Bestimmung von Carbazol positiven Materials wurde die Reaktion mit 5 ml eiskalter 0,25 M Saccharose (Fa. E. Merck, Darmstadt) gestoppt. Im Kühlraum (4°C) wurden die Knorpelscheiben dreimal mit je 5 ml Saccharose gewaschen, auf Filterpapier getrocknet und gewogen.

2.6.1. Isolierung der Chondroitinsulfatpeptide
(KLEINE et al., 14)

Zwei Drittel der Schnitte wurden in Zentrifugengläsern mit 5 mg CM-Cellulose gebundenem Papain (0,2 - 0,3 U/mg; Fa. E. Merck, Darmstadt) und mit 2 ml wässrigem Inkubationspuffer pH 6,2 (0,1 M Na-Acetat 0,005 M Na-EDTA) 48 Stunden bei $60^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad inkubiert. Um eine Konzentration von 5 % Trichloressigsäure (TCE) zu erhalten, wurden die Proben mit 0,67 ml 20 %iger TCE versetzt, danach 1 Stunde auf Eis gestellt und 20 min im Kühlraum bei 6000 Upm abzentrifugiert. Die Überstände wurden gesammelt. Der Niederschlag wurde zweimal mit 1 ml 5 %iger TCE eiskalt gewaschen. Die vereinigten Überstände wurden im Kühlraum mit festem NaHCO_3 auf den pH 6 gebracht und bei 4°C eine Woche lang gegen Aqua bidest mittels internen Mischens dialysiert (Dialysierschläuche der Fa. Union Carbide Corporation, Chicago, USA). Im dialysierten Produkt wurden Glucuronsäure, Hexosamin und Radioaktivitäten bestimmt (s. oben). In den TCE-Niederschlägen wurden die Nucleinsäuren bestimmt (s. 2.6.3.).

2.6.2. Reinigung der Chondroitinsulfatpeptide
(KLEINE et al., 14)

Die Chondroitinsulfatpeptide des Dialysates wurden durch Cetylpyridiniumchlorid- (CPC) und Alkoholfällung folgendermaßen gereinigt: Die Proben wurden mit 2 ml 10 %iger CPC bei 37°C eine Stunde inkubiert und über Nacht auf Eis gestellt. Danach wurden sie bei 10°C 60 min bei 20.000 Upm zentrifugiert. Die klaren Überstände wurden abpipettiert und verworfen. Die Niederschläge wurden nach dreimaligem Waschen bei 25°C mit je 3 ml Waschlösung (0,1 %ige CPC in

0,03 M NaCl) in jeweils 4 ml 2 M MgCl_2 und 1 ml absolutem Methanol p.A. bei 37°C aufgelöst. Nach Zugabe von 12,5 ml Äthanol p.A. kamen die Proben über Nacht ins Eisbad zur Ausfällung der Chondroitinsulfatpeptide. Danach wurden sie 20 min bei 0°C und 20.000 Upm abzentrifugiert. Die Niederschläge wurden zweimal mit je 2 ml eiskaltem 80 %igem Äthanol gewaschen, in 1 ml Aqua bidest aufgelöst und nochmals gegen Aqua bidest eine Woche lang dialysiert. Im dialysierten Produkt wurden Glucuronsäure, Hexosamin, Sulfat und Radioaktivitäten bestimmt (s. 2.7.)

2.6.3. Isolierung und Messung der Desoxyribonucleinsäure (DNS) in Knorpelschnitten
(KLEINE u. DAPPER, 19)

Im TCE-gefällten Niederschlag des Papaindigestes wurde die DNS wie folgt isoliert und bestimmt.

Die Lipide wurden durch zweimaliges Waschen mit je 2 ml 98 %igem eiskaltem Äthanol entfernt. Der Niederschlag wurde in 1,5 ml Aqua bidest suspendiert und mit 1,5 ml 10 %iger TCE versetzt. Die Proben wurden genau 15 min im Wasserbad von 90°C erhitzt, wobei sie alle 5 min gemischt wurden. Nach 10 min Zentrifugation bei 6000 Upm wurden die Überstände einzeln gesammelt und der Niederschlag mit 1 ml 5 %iger TCE gewaschen. In den vereinigten Überständen wurde die DNS mittels der Diphenylreaktion bestimmt (Doppelwerte) (SCHNEIDER, 24).

Ausführung:

1 ml Probe und 2 ml Diphenylaminreagenz (1 g Diphenylamin und 2,75 ml konz. H_2SO_4 p.A. in 100 ml Eisessig) wurden 10 min in ein siedendes Wasserbad gestellt. Die Extinktion dieser Lösung wurde bei der Wellenlänge von $\lambda = 600 \text{ nm}$ und der Schichtdicke von $d = 2 \text{ cm}$ im Zeiss-Spektralphotometer gegen

den Leerwert (1 ml 5 %ige TCE anstelle der Probe) abgelesen. Leerwerte mit CM-gebundenem Enzym ohne Knorpelschnitte unterschieden sich nicht von obigem Leerwert. Die mittlere Extinktion, die 2,526 pro 1 mg DNS beträgt, wurde mittels einer Eichkurve mit Heringssamen-DNS (Fa. Serva, Heidelberg) ermittelt, wobei die Eichkurve von 10 bis 100 µg linear verlief.

2.6.4. Isolierung des Gesamtproteins (vgl. 14)

Ein Drittel der Knorpelschnitte wurde in Zentrifugengläsern 60 h mit 5 ml 5 %iger TCE bei 0°C extrahiert. Danach wurden sie dreimal mit je 5 ml 5 %iger TCE gewaschen, wobei die Überstände nach dem Zentrifugieren verworfen wurden. Nach Auswischen der Glasränder mit trockener Watte wurden die Schnitte 20 h mit 5 ml eiskaltem Aceton p.A. extrahiert, danach zweimal mit je 5 ml Aceton p.A. gewaschen; die Überstände wurden verworfen. Die Glasränder wurden nochmals getrocknet. Die Niederschläge wurden mit 2 ml 5 %iger TCE 20 min bei 90°C erhitzt, abzentrifugiert, dreimal mit je 1 ml 5 %iger TCE bei Zimmertemperatur gewaschen und jeweils in 1 ml 1 N NaOH aufgelöst. Die Bestimmung des Gesamtproteins erfolgte mittels der Biuret-Reaktion (s. 2.7.4.)

2.7. Bausteinanalysen

2.7.1. Bestimmung von Uronsäure mittels der Carbazol-Reaktion

Die Glucuronsäure in den Chondroitinsulfatseitenketten wurde mittels der modifizierten Carbazol-Reaktion nach Bitter und Muir (2) bestimmt.

Verwendete Reagenzien:

Schwefelsäure-Reagenz: 0,025 molare Lösung von $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$ (Fa. E. Merck, Darmstadt) in konzentrierter H_2SO_4 ($d = 1,84$) gelöst.

Carbazol-Reagenz: 0,125 %ige Lösung von Carbazol (Fa. E. Merck, Darmstadt) in 96 %igem Äthanol p.A.

Ausführung:

Die im Eisbad vorgekühlten Reagenzgläser wurden mit je 5 ml kaltem Schwefelsäure-Reagenz beschickt. Danach wurde 1 ml der zu untersuchenden Probe (Doppelwerte) zugegeben; war das Volumen $< 1 \text{ ml}$, wurde mit Aqua bidest auf 1 ml aufgefüllt. Es wurden außerdem zwei Leerwerte bestimmt, die anstatt der Probe Aqua bidest enthielten. Dann wurden die Proben unter Vermeidung von Wärmeentwicklung vorsichtig im Eisbad gemischt, danach 10 min in ein siedendes Wasserbad gestellt. Nach Abkühlung mit Leitungswasser kam in jede Probe 0,2 ml Carbazol-Reagenz. Anschließend wurde nochmals gründlich gemischt und 15 min in ein siedendes Wasserbad gestellt. Nach Abkühlung wurde die Extinktion der entstandenen Rotfärbung im Photometer-Eppendorf bei der Wellenlänge von $\lambda = 546 \text{ nm}$ und der Schichtdicke von $d = 1 \text{ cm}$ gegen die Leerwerte abgelesen. Zur Bestimmung des mikromolaren Extinktionskoeffizienten wurde eine Eichkurve mit D (+) Glucurono-3,6-Lacton gelöst in H_2O (Fa. Baker, Groß-Gerau) als Standard hergestellt. Sie zeigte einen linearen Anstieg von 0,028 bis 0,568 μMol . In unserem Labor wurde ein mikromolarer Extinktionskoeffizient von $\epsilon = 3,06 \text{ E} \begin{matrix} 546 \text{ nm} \\ d=1 \text{ cm} \end{matrix}$ ermittelt.

2.7.2. Bestimmung von Aminosukcern mittels der Elson-Morgan-Reaktion

Das Galaktosamin in den Chondroitinsulfatseitenketten wurde durch Hydrolyse mit Salzsäure abgespalten und mittels der

modifizierten Elson-Morgan-Reaktion nach ANTRONOPOULOS et al. (1) bestimmt.

Verwendete Reagenzien:

37 %ige HCl p.A.

1,25 N $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$ p.A. in Aqua bidest (Fa. E. Merck, Darmstadt).

Acetyl-Aceton-Reagenz: 3 %ige Lösung von Acetyl-Aceton p.A. (Fa. E. Merck, Darmstadt) in 1,25 N Na_2CO_3 .

Ehrlichs-Reagenz: 2,5 g p-Dimethyl-amino-benzaldehyd p.A. (Fa. E. Merck, Darmstadt) in 30 ml 37 %iger HCl p.A. und 30 ml 96 %igem Äthanol p.A. gelöst.

Ausführung:

0,5 ml Probevolumen (Leerwerte enthalten 0,5 ml Aqua bidest) und 0,5 ml 37 %ige HCl wurden im Wasserbad von 100°C sechs Stunden hydrolysiert. Danach wurden die Proben in einem Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingedampft, in 1 ml Aqua bidest aufgenommen, wieder eingengt und in 0,25 ml Aqua bidest aufgenommen. Nach Zugabe von 0,5 ml Acetyl-Aceton-Reagenz wurden die Proben 60 min bei $90^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ erhitzt und anschließend mit Leitungswasser gekühlt. Genau 30 min nachdem 2 ml Äthanol p.A. und 0,25 ml Ehrlichs-Reagenz zugesetzt worden waren, wurde die Extinktion mit dem Zeiss-Spektralphotometer bei der Wellenlänge von $\lambda = 535 \text{ nm}$ und der Schichtdicke von $d = 2 \text{ cm}$ gemessen. Die Eichkurve von D-Glucosamin-HCl p.A. (Fa. E. Merck, Darmstadt), gelöst in H_2O , als Standard stieg von 0,0023 bis 0,139 μMol linear an. Der mikromolare Extinktionskoeffizient betrug $\epsilon = 12,47$
E $\begin{matrix} 535 \text{ nm} \\ d=2 \text{ cm} \end{matrix}$

2.7.3. Bestimmung von Sulfatestern mittels der Benzidin-Reaktion

Die Sulfatester in den Chondroitinsulfatseitenketten wurden durch Hydrolyse mit Ameisensäure freigesetzt und mittels

der modifizierten Benzidinmethode nach KLEINE et al. (14) bestimmt.

Verwendete Reagenzien:

7,95 M HCOOH p.A., 1 %ige Lösung von Benzidin p.A. in absolutem Äthanol p.A., 1 N HCl p.A., 0,2 %ige Lösung von NaNO_2 p.A. in Aqua bidest, 0,5 %ige Lösung von Thymol in 7,5 %iger wässriger NaOH-Lösung, sulfatfreier Glassand p.A. (alle Reagenzien von Fa. E. Merck, Darmstadt).

Ausführung:

Für die Hydrolyse wurde 1 ml Probevolumen (Dreifachwerte) mit 0,6 ml 7,95 N HCOOH vermischt (Leerwerte 1 ml H_2O bidest und 10 h bei 100°C nach Zuschmelzen der Gläser hydrolysiert). Nach Zugabe von 0,4 ml bidest. Wasser wurden von jedem Hydrolysenansatz 1,5 ml entnommen und mit 3,75 ml Benzidin-Lösung 2 h im Eisbad versetzt. Dann wurde eine Spatelspitze Glassand zugegeben und 10 min im Kühlraum bei 6000 Upm zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Reagenzgläser umgekehrt auf Filterpapier gestellt. Um die Öffnung herum wurden sie innen mit in Äthanol getränkten Wattetupfern, außen mit in Aceton getränktem Filterpapier gesäubert. Nach Zugabe von 9 ml kaltem Äthanol p.A. wurde nochmals 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Niederschlag in 2,50 ml 1 N HCl aufgenommen. Danach wurden 1 ml NaNO_2 -Lösung und 4 ml Thymol-Reagenz zugegeben. Nach 10 min Zentrifugieren wurden aus jedem Glas 0,3 ml entnommen und mit 2,7 ml Aqua bidest verdünnt. Die Extinktion der Rotfärbung wurde gegen den Leerwert mit dem Zeiss Spektralphotometer gemessen. ($\lambda = 490 \text{ nm}$, $d = 1 \text{ cm}$). Bei jeder Sulfatbestimmung wurde eine Eichmeßreihe von Na_2SO_4 p.A. (Fa. E. Merck, Darmstadt), in Aqua bidest gelöst, als Standard mitgeführt. Sie ergab eine linear ansteigende Eichkurve zwischen 0,02 und 0,06 μMol . Der mikromolare Extinktionskoeffizient betrug $\epsilon = 0,664 \pm 0,027 \text{ E } \frac{490 \text{ nm}}{d=1 \text{ cm}}$.

2.7.4. Bestimmung des Gesamtproteins mittels der
Biuret-Reaktion
nach KLEINE et al. (14) u. WEICHSELBAUM (28)

Verwendete Reagenzien:

Biuret-Reagenz: 9,0 g Kaliumnatriumtartrat (Seignettsalz) und 3,0 g pulverisiertes Kupfersulfat wurden in 400 ml einer 0,2 N Natronlauge vollständig gelöst. Anschließend wurden 5,0 g Kaliumjodid zugesetzt und mit 0,2 N Natronlauge auf 1000 ml aufgefüllt.

Ausführung:

In Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden 0,5 ml Probevolumen (Doppelwerte) und 1 ml Biuret-Reagenz eingefüllt. Nach dem Mischen wurden die Proben eine halbe Stunde zur Reaktion stehengelassen. Danach wurde die Extinktion gegen den Leerwert (0,5 ml H₂O) mit dem Eppendorf-Photometer bei der Wellenlänge von $\lambda = 546 \text{ nm}$ und der Schichtdicke von $d = 2 \text{ cm}$ bestimmt. Zur Bestimmung des Extinktionskoeffizienten pro mg Albumin wurde eine Rinderalbuminlösung (Behringwerke, Marburg), 50 mg in 100 ml Aqua bidest, verwendet. Er betrug $0,337 \text{ E}_{\substack{546 \text{ nm} \\ d=2 \text{ cm}}}$, wobei die Eichkurve von 0,05 bis 0,2 mg linear verlief.

2.7.5. Bestimmung von Serin und Leucin im
Chondroitinsulfatpeptid

Nach 7 h Hydrolyse in 6 N HCl in einer Stickstoffatmosphäre wurde das Hydrolysat der gereinigten Chondroitinsulfatpeptidfraktion (s. 2.6.2.) auf Mikrosäulen eines Mikroaminosäureanalysers (Fa. Labotron, Gelting) aufgetrennt mittels Resin 188101, Puffer 1 (0,2 N Na-Zitrat pH 3,25) und Puffer 2 (Na-Zitrat pH 4,25) sowie Norleucin als internem Standard.

2.8. Messung der Radioaktivität

2.8.1. von alkalischen Proben

Die alkalischen Proben wurden mittels eines Szintillators folgender Zusammensetzung gemessen:

8,0 g 2,5-Diphenyloxazol für Szintillationsmessungen (Fa. E. Merck, Darmstadt),

0,6 g 2,2-p-Phenylbis (4-methyl-5-phenyloxazol) (Dimethyl-POPOP) für Szintillationsmessungen (Fa. E. Merck, Darmstadt),

150 g Naphthalin für Szintillationsmessungen (Fa. E. Merck, Darmstadt) und

50 g Thixotropic Gel Powder (CAB-O-SIL, Fa. Packard, Frankfurt) gelöst in 1 l Dioxan für Szintillationsmessungen (Fa. E. Merck, Darmstadt).

In ein Zählglas wurden 15 ml Szintillator und 0,1 ml Probe eingefüllt.

2.8.2. von wässrigen neutralen Proben

Für neutrale Proben wurde obiger Szintillator ohne Thixotropic Gel Powder verwendet, pro Zählglas 15 ml Szintillator und 0,4 ml Probe.

Die Messung der ^{14}C , ^{35}S bzw. ^3H markierten Proben wurde in einem Liquid Szintillation Counter (Fa. Packard, Frankfurt; Modell 3380) mit Automatik (Modell 544) vorgenommen, der die gemessenen Impulse pro Minute in Zerfälle pro Minute (dpm) umrechnet. Die Doppelmarkierung wurde mit Tritium-Wasser und ^{14}C -Toluol (Fa. Packard, Frankfurt) als Standard in mit 0,1 ml, 0,5 ml und 1,0 ml Aqua bidest bzw. mit gleichen Volumina von 1 N NaOH gequentschten Proben programmiert. Die Einstellung der Doppelmarkierung erfolgte nach den Vorschriften der Fa. Packard, Frankfurt.

2.9. Statistische Berechnungen

Aus den Kollektiven x_i und y_i ($i = 1, 2, 3, \dots, n$) mit nicht gepaarten Daten wurden mit Hilfe einer Diehl combitron S Rechenmaschine mit Sonderprogramm Mittelwerte mit Standardabweichung und Student-t-Wert nach folgenden Formeln errechnet.

1. Arithmetisches Mittel

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

2. Standardabweichung

$$s_n = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n-1}} = \sqrt{\frac{(\sum x_i)^2 - \frac{1}{n}(\sum x_i)^2}{n-1}}$$

3. Student-t-Wert

$$t = \frac{\bar{y} - \bar{x}}{r_{\bar{x}-\bar{y}}}$$

$$\text{wobei } r_{\bar{x}-\bar{y}} = s_{x+y} \sqrt{\frac{1}{n_x} + \frac{1}{n_y}} = \sqrt{\frac{\sum (\bar{x} - x_i)^2 + \sum (y - y_i)^2}{n_x - 1 + n_y - 1}} \times \sqrt{\frac{1}{n_x} + \frac{1}{n_y}}$$

Dabei bedeuten:

n_x, n_y : Anzahl der Werte im Kollektiv

$\bar{x}, \bar{y}$: arithmetische Mittel der Werte

s_x, s_y : Standardabweichungen im Kollektiv

$r_{\bar{x}-\bar{y}}$: Streuung der Differenz der arithmetischen Mittel

t : Student-t-Wert

3. E r g e b n i s s e

3.1. Charakterisierung der Antiseren

Nach Tab. 1 zeigt das Antiserum gegen rohes CSP gegen sein spezifisches Antigen (rohes CSP) zwei langsamer wandernde Präzipitationslinien bis zum Titer 1:4, eine langsam wandernde Linie bis Titer 1:2 und eine schnell wandernde Linie bis Titer 1:2.

Das Antiserum gegen reines CSP weist gegenüber rohem CSP weniger Präzipitationslinien auf: eine langsamer wandernde Linie bis zum Titer 1:2, eine langsam wandernde Linie bis 1:2 und eine schnell wandernde Linie im unverdünnten Serum. Anti-Serum gegen Proteoglycansubunit (PGS) zeigt gegen rohes CSP nur eine langsamer wandernde Linie im Originalserum und eine schnell wandernde Linie bis zum Titer 1:2. Gegen reines CSP haben die drei verschiedenen Antiseren jeweils eine langsamer wandernde und eine schnell wandernde Präzipitationslinie, wobei der Titer der Linien beim Antiserum gegen rohes CSP und PGS 1:2 beträgt, während das Antiserum gegen reines CSP eine langsamer wandernde Linie bis zum Titer 1:2 und eine schnell wandernde nur gegen das Originalserum hat.

Gegen PGS zeigen die drei Antiseren jeweils nur eine langsamer wandernde Präzipitationslinie, die Antiseren gegen reines CSP und PGS bis zum Titer 1:4 und das Antiserum gegen rohes CSP bis 1:2. Damit hat offensichtlich das Antiserum gegen rohes CSP die größte Präzipitationskapazität gegen verschiedene CSP des Kälberrippenknorpels.

CSP-Fraktion	Antiserum			Proteoglycan subunit	Titer
	rohes CSP	Titer	reines CSP		
rohes CSP	1 L.w.Linie	1 ad 2	1 L.w.Linie	1 L.w.Linie	unver.
	2 L.s.w.Linien	1 ad 4	1 L.s.w.Linie	1 L.s.w.Linie	1 ad 2
	1 s.w.Linie	1 ad 2	1 s.w.Linie	1 s.w.Linie	1 ad 2
reines CSP	1 L.w.Linie	1 ad 2	1 L.w.Linie	1 L.w.Linie	1 ad 2
	1 s.w.Linie	1 ad 2	1 s.w.Linie	1 s.w.Linie	1 ad 2
Proteoglycan subunit (PGS)	1 L.w.Linie	1 ad 2	1 L.w.Linie	1 L.w.Linie	1 ad 4

Tabelle 1: Charakterisierung von drei Antiseren gegen verschieden gereinigte Chondroitinsulfatproteine (CSP).

L.s.w. = langsamer wandernd, L.w. = langsam wandernd,
s.w. = schnell wandernd, unver. = unverdünnt

3.2. Die Zusammensetzung des Kälberrippenknorpels

Die Tabellen 2A und 2B zeigen den Glucuronsäure-, Hexosamin Protein- und DNS-Gehalt des Kälberrippenknorpels bezogen auf Gramm Feuchtgewicht oder auf 100 µg DNS. Das molare Verhältnis von Hexosamin zu Glucuronsäure beträgt etwa 1. Die Zusammensetzung der isolierten und gereinigten Chondroitinsulfatpeptide geben die Tabellen 3A und 3B wieder, wobei hier zusätzlich die Sulfatester bestimmt und ebenfalls auf Gramm Feuchtgewicht oder auf 100 µg DNS bezogen wurden. Sulfatierungsgrad (SO_4^{2-} /Glucuronsäure) und molares Hexosamin Glucuronsäureverhältnis betragen etwa 1. Die Chondroitinsulfatpeptide aus Kälberrippenknorpel bestehen also zu gleichen Teilen aus Glucuronsäure, Hexosaminen und Sulfatestern. Außerdem werden im Peptidrest doppelt so viel Serinreste gefunden wie Leucinreste (bezogen auf 1 g Feuchtgewicht).

A	DNS µg/lg FG	Protein mg/lg FG	Glucuronsäure µMol/lg FG	Hexosamin µMol/lg FG	Hexosamin pro Glucuronsäure
Werte bezogen auf Gramm Feuchtgewicht (lg FG)	255±55 n=56	27,9±3,4 n=79	114,1±7,0 n=46	121,5±13,5 n=18	1,07±0,12 n=15

B	DNS µg/lg FG	Protein mg/100µg DNS	Glucuronsäure µMol/100µg DNS	Hexosamin µMol/100µg DNS
Werte bezogen auf 100 µg Desoxyribonu- cleinsäure (DNS)	255±55 n=56	11,3±2,1 n=56	48,8±9,2 n=30	47,6±5,3 n=18

Tabelle 2A, 2B: Die Zusammensetzung des Rippenknorpels vom Kalb

A	Glucuronsäure (Glc. S) μMol/lg FG	Hexosamin (Hex-NH ₂) μMol/lg FG	Hex-NH ₂ pro Glc. S	Sulfatester μMol/lg FG	Sulfat pro Glc. S	Serinreste μMol/lg FG	Leucinreste μMol/lg FG
Werte bezogen auf Gramm Feuchtgewicht (lg FG)	91,7 $\pm$ 7,9 n=53	92,0 $\pm$ 6,5 n=12	1,00 $\pm$ 0,08 n=12	95,0 $\pm$ 8,7 n=19	1,01 $\pm$ 0,06 n=19	1,98 $\pm$ 0,40	1,03 $\pm$ 0,57

B	Glucuronsäure (Glc. S) μMol/100 μg DNS	Hexosamin μMol/100 μg DNS	Sulfatester μMol/100 μg DNS	Serinreste μMol/100 μg DNS	Leucinreste μMol/100 μg DNS
Werte bezogen auf 100 μg Desoxyribonu- cleinsäure (DNS)	40,1 $\pm$ 9,2 n=34	36,1 $\pm$ 2,5 n=12	38,8 $\pm$ 9,7 n=9	0,78 $\pm$ 0,16	0,40 $\pm$ 0,22

Tabelle 3A, 3B: Die Zusammensetzung der isolierten und gereinigten Chondroitinsulfatpeptide aus Kälberrippenknorpel

3.3. Der Einfluß von Anti-Proteoglycan-Seren auf die Biosynthese von Chondroitinsulfatproteinen und Gesamtprotein im Kälberrippenknorpel in vitro

3.3.1. Anti-Proteoglycansubunit (PGS)-Serum

A. Kleinere Mengen des Antiserums gegen PGS (0,3 ml bei 2,7 ml Medium) zeigen bei Vorinkubation bei 1°C nach 1,5 Stunden im ungereinigten Papaindigest keine signifikante Veränderung des Einbaus von ^{35}S -Sulfat, ^3H -Glucosamin, ^3H -Leucin und ^{14}C -Serin gegenüber Kontrollen mit Normalserum, im durch CPC-Fällung gereinigten Produkt meistens eine leichte Abnahme der Einbauraten dieser radioaktiven Vorstufen in den Chondroitinsulfat- und Peptidanteil (Tab. 4, 5). Nach 4,5 Stunden ist ein leicht verminderter Einbau von ^3H -Leucin und ^{14}C -Serin in den Peptidanteil zu verzeichnen, ebenso von Radiosulfat in den Sulfopoly-saccharidanteil, jedoch ein leicht erhöhter Einbau von ^3H -Glucosamin sowohl im Papaindigest als auch im durch CPC-Fällung gereinigten Produkt. Bei den hier verschiedenen Bezugsgrößen ergeben sich jedoch unterschiedliche Aussagen (s. Tab. 4a,b und 5a,b). Ein Blick auf Tabelle 6 zeigt, daß die Inkorporation von ^3H -Leucin in die Gesamtproteine nach 1,5 Stunden und 4,5 Stunden Vorinkubation leicht vermindert, von ^{14}C -Serin leicht vermehrt ist gegenüber Kontrollen (Bezugsgrößen: 1 mg Protein oder 1 g Feuchtgewicht). Alle diese Unterschiede sind jedoch nicht signifikant.

B. Größere Mengen des Antiserums gegen PGS (0,8 ml plus 2,2 ml Medium) bewirken bei verschieden langer Vorinkubation bei 37°C nur wenig signifikante Unterschiede im Einbau radioaktiv markierter Vorstufen in den Sulfopoly-saccharid- und Peptidanteil im Vergleich zu Kontrollen (s. Tab. 7a,b,8). Nach einer Stunde und vier Stunden Vorinkubation bei 37°C entspricht der Einbau von Radiosulfat

in den Sulfopolysaccharidanteil dem der Kontrolle, nach zwei Stunden ist er um 20 % nicht signifikant vermindert. ^3H -Hexosamin wird nach einer Stunde und vier Stunden um 20 bis 30 % nicht signifikant weniger eingebaut; nach zwei Stunden entspricht der Einbau dem der Kontrolle. ^3H -Leucin wird nach zwei Stunden um 15 % vermindert und nach vier Stunden um 28 % signifikant vermehrt in den Peptidanteil eingebaut. Nach einer Stunde Vorinkubation ist keine Wirkung des Antiserums vorhanden. Die Einbaurrate von ^{14}C -Serin ist nach zwei Stunden und vier Stunden leicht erhöht bzw. ohne Unterschied im Vergleich zu Kontrollen, nach einer Stunde um 15 % nicht signifikant vermindert (s. Tab. 7b). Der Einbau von ^3H -Leucin in die Gesamtproteine ist durch Zugabe dieses Antiserums signifikant vermindert, nach einer Stunde um 50 % und nach zwei und vier Stunden um 20 %. Die Einbaurrate von ^{14}C -Serin ist dagegen geringgradiger vermindert, nämlich nur um 8 bis 18 % (s. Tab. 8). Damit entwickelt Anti-PGS-Serum in höherer Konzentration bei 37°C Vorinkubation hauptsächlich einen inhibitorischen Effekt auf die Gesamtproteinbiosynthese in Knorpelzellen.

Sulfopolysaccharidanteil

Vorinkub. bei 1°C	³⁵ SO ₄ dpm/Glc.S.+	dpm/lg FG	³ H-Glucosamin dpm/Hex-NH ₂ +	dpm/lg FG
Normalserum	8.640±1.190 1,00 n=2	704.295±200.133 1,00 n=2	16.820±4.450 1,00 n=2	768.580±226.430 1,00 n=2
1,5 h				
Antiserum	10.430±112 1,21 n=2	704.610±30.730 1,00 n=2	15.400±2.720 0,92 n=2	1.013.560±335.960 1,32 n=2
Normalserum	6.540±450 1,00 n=2	512.060±13.010 1,00 n=2	11.150±2.780 1,00 n=2	792.640±251.190 1,00 n=2
4,5 h				
Antiserum	6.110±97 0,93 n=2	454.520±4.620 0,89 n=2	16.860±2.580 1,51 n=2	924.290±45.750 1,17 n=2

Tabelle 4a: Der Einfluß von Antiserum gegen PCS (Protein-Polysaccharidsubunit) auf die Biosynthese von Chondroitinsulfatprotein im Rippenknorpel vom Kalb: Dialysiertes Papain-Digest. Inkubationsansatz A s. 2.5.

+ pro µMol

Vorinkubat. bei 1°C	S u l f o p o l y s a c c h a r i d a n t e i l						³ H-Glucosamin	
	³⁵ SO ₄ dpm/SO ₄ ²⁺	³⁵ SO ₄ dpm/1g FG	³⁵ SO ₄ dpm/100µg DNS	dpm/Hex-NH ₂ ⁺	dpm/1g FG	dpm/100µg DNS		
Normalserum	10.370±3.220 1,00 n=2	766.640±291.180 1,00 n=2	300.640±114.190 1,00 n=2	4.030±340 1,00 n=2	159.090±80.970 1,00 n=2	62.390±31.760 1,00 n=2		
1,5 h								
Antiserum	8.120±940 0,78 n=2	545.670±183.200 0,71 n=2	213.990±71.840 0,71 n=2	3.450±620 0,86 n=2	174.320±37.260 1,10 n=2	68.360±14.610 1,10 n=2		
Normalserum	6.270±690 1,00 n=2	488.610±19.660 1,00 n=2	191.610±7.710 1,00 n=2	2.230±240 1,00 n=2	164.620±47.320 1,00 n=2	64.560±18.550 1,00 n=2		
4,5 h								
Antiserum	6.660±470 1,06 n=2	428.360±23.390 0,88 n=2	167.980±9.170 0,88 n=2	3.010±340 1,35 n=2	241.050±33.480 1,46 n=2	94.530±13.130 1,46 n=2		

Tabelle 4b: Der Einfluß von Antiserum gegen PGS (Protein-Polysaccharid-Subunit) auf die Biosynthese von Chondroitinsulfatprotein im Rippenknorpel vom Kalb: CPC-Alkohol-gefälltes Produkt. Inkubationsansatz A s. 2.5.

+ pro µMol

Vorinkub. bei 1°C	P e p t i d a n t e i l			
	¹⁴ C-Serin dpm/Glc.S. +	dpm/lg FG	³ H-Leucin dpm/Glc.S. +	dpm/lg FG
Normalserum	1.29±149 1,00 n=2	68.66±13.260 1,00 n=2	2.46±210 1,00 n=2	199.74±47.740 1,00 n=2
1,5 h				
Antiserum	1.21±250 0,94 n=2	87.29±28.140 1,27 n=2	2.86±64 1,16 n=2	193.09±6.200 0,97 n=2
Normalserum	1.25±720 1,00 n=2	92.70±43.360 1,00 n=2	2.40±380 1,00 n=2	188.76±38.300 1,00 n=2
4,5 h				
Antiserum	92±2,1 0,73 n=2	60.89±1.090 0,66 n=2	1.89±56 0,79 n=2	140.18±3.380 0,74 n=2

Tabelle 5a: Der Einfluß von Antiserum gegen PGS auf die Biosynthese von Chondroitinsulfatprotein im Rippenknorpel vom Kalb: Dialysiertes Papain-Digest.
Inkubationsansatz A s. 2.5.

+ pro µMol

P e p t i d a n t e i l						
Vorinkubat. bei 1°C	¹⁴ C-Serin		³ H-Leucin			
	dpm/Glc.S. ⁺	dpm/lg FG	dpm/100µg DNS	dpm/Glc.S. ⁺	dpm/lg FG	dpm/100µg DNS
Normalserum	1.010±350 1,00 n=2	40.710±10.960 1,00 n=2	15.960±4.300 1,00 n=2	2.000±300 1,00 n=2	146.970±33.530 1,00 n=2	57.630±13.150 1,00 n=2
1,5 h						
Antiserum	680±110 0,68 n=2	36.880±9.210 0,91 n=2	14.460±3.610 0,91 n=2	2.080±112 1,04 n=2	116.460±51.280 0,79 n=2	45.670±20.110 0,79 n=2
Normalserum	490±41 1,00 n=2	36.930±6.770 1,00 n=2	14.480±2.660 1,00 n=2	1.420±160 1,00 n=2	110.630±4.370 1,00 n=2	43.380±1.710 1,00 n=2
4,5 h						
Antiserum	520±41 1,06 n=2	43.500±4.140 1,18 n=2	17.060±1.620 1,18 n=2	1.230±40 0,87 n=2	79.360±7.370 0,72 n=2	31.120±2.890 0,72 n=2

Tabelle 5b: Der Einfluß von Antiserum gegen PGS auf die Biosynthese von Chondroitinsulfatprotein im Rippenknorpel von Kalb: CPC-Alkohol-gefälltes Produkt.

Inkubationsansatz A s. 2.5.

+ pro µMol

Vorinkub. bei 10°C	Gesamtprotein					
	Einbau von ^3H -Leucin		Einbau von ^{14}C -Serin			
	dpm/lg FG	dpm/mg Prot.	dpm/100 µg DNS	dpm/lg FG	dpm/mg Prot.	dpm/100 µg DNS
Normal- serum	5.413.030±638.620 1,00	184.230±26.660 n=2	2.122.760±250.440 n=2	876.090±133.980 1,00	30.440±2.400 n=2	343.570±52.542 n=2
1,5 h	4.702.180±223.290	148.450±1.200	1.843.990±87.570	1.081.350±417.080	38.650±14.960	424.060±163.560
Anti- serum	0,87	n=2	0,81	n=2	1,27	n=2
Normal- serum	4.580.820±637.710 1,00	158.690±19.490 n=2	1.796.400±250.080 n=2	1.694.120±161.840 1,00	62.350±6.660 n=2	664.360±63.470 n=2
4,5 h	3.890.220±548.440	133.990±10.920	1.525.580±215.070	1.899.960±20.550	58.490±4.460	745.080±8.060
Anti- serum	0,85	n=2	0,85	n=2	0,94	n=2

Tabelle 6: Der Einfluß von Antiserum gegen PGS auf die Inkorporation von ^3H -Leucin und ^{14}C -Serin in die Gesamtproteine des Kälberripenknorpels.
Inkubationsansatz A s. 2.5.

Sulfopolysaccharidanteil

Vorinkubat. bei 37°C	³⁵ SO ₄		³ H-Glucosamin		
	dpm/SO ₄ ²⁺	dpm/lg FG	dpm/Hex-NH ₂ ⁺	dpm/lg FG	dpm/100lg DNS
Normalserum	4.46±450 1,00 n=6	418.93±40.460 1,00 n=6	1.17±54 1,00 n=6	107.64±4.970 1,00 n=6	35.73±1.660 n=6
1 h					
Antiserum	4.85±110 1,04 n=2	436.02±9.890 1,04 n=2	91±40 0,78 n=1	83.72±3.070 0,78 n=1	27.91±1.050 n=1
Normalserum	4.24±710 1,00 n=8	381.18±63.830 1,00 n=8	1.49±220 1,00 n=8	137.08±20.240 1,00 n=8	45.69±6.750 n=8
2 h					
Antiserum	3.43±650 0,81 n=2	308.36±58.440 0,81 n=2	1.38±40 0,93 n=2	126.96±3.680 0,93 n=2	42.32±1.230 n=2
Normalserum	2.50±270 1,00 n=5	225.65±24.270 1,00 n=5	1.94±400 1,00 n=5	178.48±36.800 1,00 n=5	59.39±12.270 n=5
4 h					
Antiserum	2.52±40 1,01 n=2	226.55±3.600 1,01 n=2	1.38±30 0,71 n=1	126.96±5.640 0,71 n=1	42.32±3.630 n=1

Tabelle 7a: Der Einfluß von Antiserum gegen PGS auf die Biosynthese von Chondroitinsulfatprotein im Rippenknorpel vom Kalb: CPC-Alkohol-gefälltes Produkt. Inkubationsansatz B s. 2.5.

+ pro µMol

Peptidantel

Vorinkubat. bei 37°C	³ H-Leucin			¹⁴ C-Serin		
	dpm/μMol Leu	dpm/lg FG	dpm/100μg DNS	dpm/μMol Ser	dpm/lg FG	dpm/100μg DNS
Normalserum	24.67±3.060	28.12±3.490	9.37±1.160	1.10±80	3.14±230	1.05±76
1 h	1,00 n=6	1,00 n=6	1,00 n=6	1,00 n=6	1,00 n=6	1,00 n=6
Antiserum	26.18±4.280	29.85±4.880	9.95±1.630	940	2.680	890
1 h	1,06 n=2	1,06 n=2	1,06 n=2	0,85 n=1	0,85 n=1	0,85 n=1
Normalserum	22.48±4.770	25.63±5.440	8.54±1.810	1.030±88	2.94±250	980±84
2 h	1,00 n=8	1,00 n=8	1,00 n=8	1,00 n=8	1,00 n=8	1,00 n=8
Antiserum	19.11±2.650	21.79±3.020	7.26±1.010	1.17±540	3.33±110	1.11±38
1 h	0,85 n=2	0,85 n=2	0,85 n=2	1,14 n=2		
Normalserum	14.59±1.970	16.63±2.250	5.54±750	380±40	1.08±110	360±38
4 h	1,00 n=5	1,00 n=5	1,00 n=5	1,00 n=5	1,00 n=5	1,00 n=5
Antiserum	18.65±820	21.26±930	7.09±310	390	1.110	370
1 h	1,28 p=0,05 n=2	1,28 n=2	1,28 n=2	1,03 n=1	1,03 n=1	1,03 n=1

Tabelle 7b: Der Einfluß von Antiserum gegen PCS auf die Biosynthese von Chondroitinsulfatprotein im Rippenknorpel vom Kalb: CPC-Alkohol-gefälltes Produkt.
Inkubationsansatz B s. 2.5.

Vorinkubat. bei 37°C	Gesamtprotein: Einbau von				¹⁴ C - Serin			
	³ H - Leucin dpm/lg FG	dpm/mg Prot.	dpm/100µg DNS	dpm/lg FG	dpm/mg Prot.	dpm/100µg DNS		
Normalserum	62.16±3.07o 1,00 n=6	1.734.26±85.65o 1,00 n=6	578.09±28.55o 1,00 n=6	17.39±1.95o 1,00 n=6	485.18±54.41o 1,00 n=6	161.74±18.14o 1,00 n=6		
1 h								
Antiserum	32.03±5.25o p < 0,001 0,52 n=2	893.36±146.48o p < 0,001 0,52 n=2	297.79±48.83o p < 0,001 0,52 n=2	14.23o 0,82 n=1	397.02o 0,82 n=1	132.34o 0,82 n=1		
Normalserum	66.98±4.74o 1,00 n=8	1.868.74±132.25o 1,00 n=8	622.91±44.08o 1,00 n=8	11.86±1.07o 1,00 n=1	330.89±29.85o 1,00 n=8	110.30±9.95o 1,00 n=8		
2 h								
Antiserum	52.78±15.17o p < 0,001 0,79 n=2	1.472.56±423.24o p < 0,001 0,79 n=2	490.85±141.08o p < 0,001 0,79 n=2	10.47±58o 0,88 n=2	292.11±16.18o 0,88 n=2	97.37±5.39o 0,88 n=2		
Normalserum	33.85±3.34o 1,00 n=5	944.42±93.19o 1,00 n=5	314.81±31.06o 1,00 n=5	7.92±8o 1,00 n=5	220.97±2.23o 1,00 n=5	73.66±74o 1,00 n=5		
4 h								
Antiserum	26.74±2.91o p < 0,05 0,8o n=2	746.05±81.19o p < 0,05 0,8o n=2	248.68±27.06o p < 0,05 0,8o n=2	7.30o 0,92 n=1	203.67o 0,92 n=1	67.89o 0,92 n=1		

Tabelle 8: Der Einfluß von Antiserum gegen PGS auf die Inkorporation von ³H-Leucin und ¹⁴C-Serin in die Gesamtproteine des Kälberripenknorpels.
Inkubationsansatz B s. 2.5.

3.3.2. Antiserum gegen reines Chondroitinsulfatprotein (CSP)

Das Antiserum gegen reines CSP entwickelt ebenfalls nur eine geringe Wirkung auf die Biosynthese der Chondroitinsulfatproteine. Während der Einbau von Radiosulfat in den Sulfo-polysaccharidanteil nach einer Stunde, zwei Stunden und vier Stunden Vorinkubation kaum verändert ist im Vergleich zu Kontrollen, ist der Einbau von ^3H -Hexosamin nach einer Stunde signifikant um 25 % vermindert; nach zwei und vier Stunden sind keine Unterschiede zu Kontrollen vorhanden. Die Einbaurate von ^3H -Leucin in den Peptidanteil ist nach einer Stunde und zwei Stunden unverändert gegenüber Kontrollen, nach vier Stunden um 29 % vermindert, jedoch nicht signifikant. ^{14}C -Serin wird nach einer Stunde um 17 % signifikant vermindert in den Peptidanteil eingebaut; wird länger inkubiert, sind keine Unterschiede zu Kontrollen vorhanden. Die Inkorporation radioaktiv markierter Precursor in die Gesamtproteine (s. Tab. 10) ist teilweise signifikant vermindert, nämlich beim ^3H -Leucin nach zwei und vier Stunden um 25 %, beim ^{14}C -Serin nach einer Stunde um 30 %. Nach zwei und vier Stunden ist der Einbau von ^{14}C -Serin um 12 % vermindert gegenüber Kontrollen. Der Einbau von ^3H -Leucin entspricht nach einer Stunde dem der Kontrolle (s. Tab. 10). Damit entwickelt Antiserum gegen reines CSP ähnliche Effekte wie Anti-PGS-Serum.

Vorinkubat. bei 37°C	S u l f o p o l y s a c c h a r i d a n t e i l					³ H-Glucosamin	
	³⁵ SO ₄ dpm/1g FG	dpm/100µg DNS	dpm/Hex-NH ₂	dpm/1g FG	dpm/100µg DNS	dpm/1g FG	dpm/100µg DNS
Normalserum	4. 660±450 1,00 n=6	418.930±40.460 1,00 n=6	139.640±13.490 1,00 n=6	1.170±54 1,00 n=6	107.640±4.970 1,00 n=6	35.900±1.660 1,00 n=6	
1 h	5.230±840 1,12 n=2	470.180±75.520 1,12 n=2	156.730±25.170 1,12 n=2	870±60 0,75 n=2	80.040±5.520 0,75 n=2	26.680±1.840 0,75 n=2	
Antiserum	4.240±710 1,00 n=8	381.180±63.830 1,00 n=8	127.060±21.280 1,00 n=8	1.490±220 1,00 n=8	137.080±20.240 1,00 n=8	45.690±6.750 1,00 n=8	
2 h	4.840±220 1,14 n=2	435.120±19.330 1,14 n=2	145.040±6.440 1,14 n=2	1.600±190 1,07 n=2	147.200±17.480 1,07 n=2	49.080±5.830 1,07 n=2	
Antiserum	2.510±270 1,00 n=5	225.650±24.270 1,00 n=5	75.220±8.090 1,00 n=5	1.940±400 1,00 n=5	178.480±36.800 1,00 n=5	59.490±12.270 1,00 n=5	
Normalserum	2.510±270 1,00 n=5	225.650±24.270 1,00 n=5	75.220±8.090 1,00 n=5	1.940±400 1,00 n=5	178.480±36.800 1,00 n=5	59.490±12.270 1,00 n=5	
4 h	2.240 0,89 n=1	201.380 0,89 n=1	67.130 0,89 n=1	2.080 1,07 n=1	191.360 1,07 n=1	63.790 1,07 n=1	
Antiserum	2.240 0,89 n=1	201.380 0,89 n=1	67.130 0,89 n=1	2.080 1,07 n=1	191.360 1,07 n=1	63.790 1,07 n=1	

Tabelle 9a: Der Einfluß von Antiserum gegen reines CSP auf die Biosynthese von Chondroitinsulfatprotein im Rippenknorpel vom Kalb: CFC-Alkohol-gefälltes Produkt.
Inkubationsansatz B s. 2.5.

+ pro µMol

Vorinkubat. bei 37°C	Peptidanteil					
	³ H-Leucin			¹⁴ C-Serin		
	dpm/μMol Leu	dpm/lg FG	dpm/100μg DNS	dpm/μMol Ser	dpm/lg FG	dpm/100μg DNS
Normalserum	24.67±3.060	28.12±3.490	9.37±1.160	1.10±80	3.14±230	1.05±76
1 h	1,00 n=6	1,00 n=6	1,00 n=6	1,00 n=6	1,00 n=6	1,00 n=6
Antiserum	25.26±140	28.80±160	9.60±53	92±23	2.62±66	87±22
	1,02 n=2	1,02 n=2	1,02 n=2	0,83 n=2	0,83 n=2	0,83 n=2
Normalserum	22.48±4.770	23.15±4.910	9.08±1.930	1.03±88	2.04±170	80±70
2 h	1,00 n=8	1,00 n=8	1,00 n=8	1,00 n=8	1,00 n=8	1,00 n=8
Antiserum	20.37±280	23.22±320	7.74±110	1.150	3.280	1.090
	0,91 n=2	0,91 n=2	0,91 n=2	1,12 n=1	1,12 n=1	1,12 n=1
Normalserum	14.59±1.970	16.63±2.250	5.54±750	38±40	1.08±110	36±38
4 h	1,00 n=5	1,00 n=5	1,00 n=5	1,00 n=5	1,00 n=5	1,00 n=5
Antiserum	10.350	11.800	3.930	390	1.110	370
	0,71 n=1	0,71 n=1	0,71 n=1	1,04 n=1	1,04 n=1	1,04 n=1

Tabelle 9b: Der Einfluß von Antiserum gegen reines CSP auf die Biosynthese von Chondroitinsulfatprotein im Rippenknorpel vom Kalb: CPC-Alkohol-gefälltes Produkt.
Inkubationsansatz B s. 2.5.

Vorinkubat. bei 37°C	Gesamtprotein: Einbau von				¹⁴ C-Serin			
	³ H-Leucin		DNS		FG		Prot.	
	dpm/lg	dpm/mg Prot.	dpm/100µg	dpm/lg	dpm/100µg	dpm/mg	dpm/100µg	DNS
Normalserum	62.16±3.070 1,00 n=6	1.734.26±85.650 n=6	578.09±28.550 1,00 n=6	17.39±1.950 1,00 n=6	485.18±54.400 1,00 n=6	161.74±18.140 1,00 n=6		
1 h	59.26±220 0,95 n=2	1.653.35±6.140 n=2	551.12±2.050 0,95 n=2	12.23±980 p < 0,02 0,70 n=2	341.22±27.340 p < 0,02 0,70 n=2	113.74±9.070 p < 0,02 0,70 n=2		
Antiserum								
Normalserum	66.98±4.740 1,00 n=8	1.868.74±132.250 n=8	622.91±44.080 1,00 n=8	11.86±1.070 1,00 n=8	330.89±29.850 1,00 n=8	110.30±9.950 1,00 n=8		
2 h	49.01±3.830 p < 0,001 0,73 n=2	1.367.38±106.860 p < 0,001 n=2	455.79±35.620 p < 0,001 0,73 n=2	10.380 0,88 n=1	289.600 0,88 n=1	96.530 0,88 n=1		
Antiserum								
Normalserum	33.85±3.340 1,00 n=5	944.42±93.190 n=5	314.81±31.060 1,00 n=5	7.92±80 1,00 n=5	220.97±2.230 1,00 n=5	73.66±740 1,00 n=5		
4 h	26.18±5.220 p < 0,05 0,77 n=2	730.42±145.640 p < 0,05 n=2	243.47±48.550 p < 0,05 0,77 n=2	7.000 0,88 n=1	195.300 0,88 n=1	65.100 0,88 n=1		
Antiserum								

Tabelle 10: Der Einfluß von Antiserum gegen reines CSP auf die Inkorporation von ³H-Leucin und ¹⁴C-Serin in die Gesamtproteine des Kälberripenknorpels.
Inkubationsansatz B s. 2.5.

3.3.3. Antiserum gegen rohes Chondroitinsulfatprotein (CSP)

Das Antiserum gegen rohes CSP bewirkt die stärksten Einbauhemmungen radioaktiv markierter Vorstufen in die Chondroitinsulfatpeptide im Vergleich zu Kontrollen (s. Tab. 11a, 11b, 12) bzw. zu den beiden anderen untersuchten Antisera (s. Tab. 4 - 10). Sowohl im Peptid- als auch im Sulfopolysaccharidanteil ist diese Verminderung am stärksten nach zwei Stunden Vorinkubation. Beim Einbau von Radiosulfat tritt eine signifikante Hemmung um 64 %, beim ^3H -Hexosamin eine ebenfalls signifikante Hemmung um 42 % auf. Der Einbau von ^3H -Leucin und ^{14}C -Serin in den Peptidanteil ist nicht so stark vermindert, jedoch signifikant gegenüber Kontrollen: ^3H -Leucin um 38 % und ^{14}C -Serin um 26 %.

Nach einer Stunde ist der Einbau von Radiosulfat und ^3H -Hexosamin in den Sulfopolysaccharidanteil um 10 bis 20 % vermindert, während der Einbau von ^3H -Leucin und ^{14}C -Serin in den Peptidanteil um 30 % signifikant erhöht ist im Vergleich zu Kontrollen.

Nach vier Stunden treten geringere, jedoch signifikante Einbauhemmungen von Radiosulfat, ^3H -Hexosamin (40 %) und von ^3H -Leucin (20 %) auf. Die Inkorporation von ^{14}C -Serin ist nicht verändert im Vergleich zu Kontrollen.

Der Einbau von ^3H -Leucin und ^{14}C -Serin in die Gesamtproteine (s. Tab. 12) ist gegenüber Kontrollen ebenfalls nach zwei Stunden am stärksten gehemmt. Beim ^3H -Leucin tritt eine signifikante Hemmung um 46 %, beim ^{14}C -Serin um 33 % auf. Nach einer Stunde und vier Stunden Vorinkubation wird ^3H -Leucin um etwa 40 % signifikant vermindert eingebaut; auf die Inkorporation von ^{14}C -Serin zeigt das Antiserum nach einer Stunde keine Wirkung, nach vier Stunden eine signifikante Hemmung um 15 %.

Vorinkubat. bei 37°C	Sulfopolysaccharidanteil				³ H-Hexosamin			
	dpm/μMol SO ₄ ²⁻	dpm/lg FG	dpm/100mg DNS	dpm/μMol Hex-NH ₂	dpm/lg FG	dpm/100mg DNS		
Normalserum	4.66±450 1,00 n=6	418.93±40.460 1,00 n=6	139.64±13.490 1,00 n=6	1.17±54 1,00 n=6	107.64±4.970 1,00 n=6	35.90±1.660 1,00 n=6		
1 h	3.92±390 p < 0,05 0,84 n=3	352.41±35.060 p < 0,05 0,84 n=3	117.37±11.690 p < 0,05 0,84 n=3	1.04±110 0,89 n=3	95.68±10.120 0,89 n=3	31.89±3.370 0,89 n=3		
Antiserum								
Normalserum	4.235±710 1,00 n=8	402.33±67.450 1,00 n=8	157.78±26.460 1,00 n=8	1.49±220 1,00 n=8	137.08±20.240 1,00 n=8	53.76±7.940 1,00 n=8		
2 h								
Antiserum	1.88±410 p < 0,001 0,36 n=4	169.01±36.860 p < 0,001 0,36 n=4	56.34±12.290 p < 0,001 0,36 n=4	870±300 p < 0,005 0,58 n=4	80.04±27.600 p < 0,005 0,58 n=4	26.68±9.200 p < 0,005 0,58 n=4		
Antiserum abges.m.C-SP	4.18±530 0,99 n=3	375.78±47.650 0,99 n=3	125.26±15.880 0,99 n=3	1.28±160 0,86 n=3	117.76±14.720 0,86 n=3	39.25±4.910 0,86 n=3		
Normalserum	2.51±270 1,00 n=5	225.65±24.270 1,00 n=5	75.22±8.090 1,00 n=5	1.94±400 1,00 n=5	178.48±36.800 1,00 n=5	59.49±12.270 1,00 n=5		
4 h								
Antiserum	1.57±260 p < 0,001 0,63 n=3	141.14±23.370 p < 0,001 0,63 n=3	47.05±7.790 p < 0,001 0,63 n=3	1.24±30 0,64 n=3	114.08±2.760 0,64 n=3	38.03±920 0,64 n=3		

Tab. 11a: Der Einfluss von Antiserum gegen rohes CSP und von mit rohem CSP abgesättigtem Antiserum auf die Biosynthese von Chondroitinsulfatprotein im Rippenknorpel vom Kalb: CPC-Alkohol-gefälltes Produkt.
Inkubationsansatz B s. 2.5.

Vorinkubat. bei 37°C	P e p t i d a n t e i l					¹⁴ C - Serin	
	³ H - Leucin dpm/μMol Leu	³ H - Leucin dpm/lg FG	dpm/looug DNS	dpm/μMol Ser	dpm/lg FG	dpm/looug DNS	
Normalserum	24.67±3.060 1,00 n=6	28.12±3.490 1,00 n=6	9.37±1.160 1,00 n=6	1.10±80 1,00 n=6	3.14±230 1,00 n=6	1.05±76 1,00 n=6	
1 h	32.20±13.950 1,30 n=3	36.70±15.900 1,30 n=3	12.23±5.300 1,30 n=3	1.43±13 p<0,01 1,30 n=3	4.08±37 p<0,01 1,30 n=3	1.36±12 p<0,01 1,30 n=3	
Antiserum							
Normalserum	22.48±4.770 1,00 n=8	25.63±5.440 1,00 n=8	8.54±1.810 1,00 n=8	1.03±88 1,00 n=8	2.94±250 1,00 n=8	98±84 1,00 n=8	
2 h							
Antiserum	13.87±3.440 p<0,02 0,62 n=4	15.81±3.920 p<0,02 0,62 n=4	5.27±1.310 p<0,02 0,62 n=4	76±170 p<0,01 0,74 n=4	2.17±480 p<0,01 0,74 n=4	72±160 p<0,01 0,74 n=4	
Antiserum	21.28±4.310 0,95 n=3	21.92±4.440 0,95 n=3	8.59±1.740 0,95 n=3	94±170 0,91 n=3	1.86±90 0,91 n=3	73±30 0,91 n=3	
abges. m. C-CSP							
Normalserum	14.59±1.970 1,00 n=5	16.63±2.250 1,00 n=5	5.54±750 1,00 n=5	38±40 1,00 n=5	1.08±110 1,00 n=5	36±38 1,00 n=5	
4 h							
Antiserum	11.50±1.310 0,79 n=3	13.11±1.490 0,79 n=3	4.37±500 0,79 n=3	37±25 0,99 n=3	1.05±71 0,99 n=3	35±24 0,99 n=3	

Tab. 11b: Der Einfluß von Antiserum gegen rohes CSP und von mit rohem CSP abgesättigtem Antiserum auf die Biosynthese von Chondroitinsulfatprotein im Rippenknorpel vom Kalb: CPC-Alkohol-gefälltes Produkt. Inkubationsansatz B s. 2.5.

Gesamtprotein : Einbau von ^{14}C - Serin					
Vorinkubat. bei 37°C	^3H - Leucin dpm/mg Prot.	dpm/lg FG	dpm/100ug DNS	dpm/mg Prot.	dpm/lg FG
Normalserum	62.16 $\pm$ 3.07 1,00 n=6	1.734.26 $\pm$ 85.650 1,00 n=6	578.09 $\pm$ 28.550 1,00 n=6	17.39 $\pm$ 1.950 1,00 n=6	485.18 $\pm$ 54.410 161.74 $\pm$ 18.140 1,00 n=6
1 h	38.86 $\pm$ 5.100 p < 0,001 0,63 n=3	1.084.19 $\pm$ 142.290 p < 0,001 0,63 n=3	361.40 $\pm$ 47430 p < 0,001 0,63 n=3	16.71 $\pm$ 1.450 0,96 n=3	466.21 $\pm$ 40.460 0,96 n=3
Antiserum					
Normalserum	66.98 $\pm$ 4.740 1,00 n=8	1.868.74 $\pm$ 132.250 1,00 n=8	622.91 $\pm$ 44.080 1,00 n=8	11.86 $\pm$ 1.070 1,00 n=8	330.89 $\pm$ 29.850 1,00 n=8
2 h	36.33 $\pm$ 3.160 p < 0,001 0,54 n=4	1.013.61 $\pm$ 88.160 p < 0,001 0,54 n=4	337.87 $\pm$ 29.390 p < 0,001 0,54 n=4	7.92 $\pm$ 0,840 p < 0,001 0,67 n=4	220.97 $\pm$ 23.440 p < 0,001 0,67 n=4
Antiserum					
Antiserum abges. mit C-CSP	42.14 $\pm$ 8.380 p < 0,001 0,63 n=3	1.175.71 $\pm$ 233.800 p < 0,001 0,63 n=3	391.90 $\pm$ 77.930 p < 0,001 0,63 n=3	9.46 $\pm$ 0,790 p < 0,001 0,80 n=3	263.93 $\pm$ 22.040 p < 0,001 0,80 n=3
Normalserum	33.85 $\pm$ 3.340 1,00 n=5	944.42 $\pm$ 93.190 1,00 n=5	314.81 $\pm$ 31.060 1,00 n=5	7.92 $\pm$ 0,80 1,00 n=5	220.97 $\pm$ 2.230 1,00 n=5
4 h					
Antiserum	21.70 $\pm$ 5.370 p < 0,005 0,64 n=3	605.43 $\pm$ 149.820 p < 0,005 0,64 n=3	201.81 $\pm$ 49.940 p < 0,005 0,64 n=3	6.70 $\pm$ 0,560 p < 0,01 0,85 n=3	186.93 $\pm$ 15.620 p < 0,01 0,85 n=3
					73.66 $\pm$ 7.350 p < 0,001 0,80 n=3 73.66 $\pm$ 740 1,00 n=5 62.31 $\pm$ 5.210 p < 0,01 0,85 n=3

Tab. 12: Der Einfluß von Antiserum gegen rohes CSP und von mit rohem CSP abgesättigtem Antiserum auf die Inkorporation von ^3H -Leucin und ^{14}C -Serin in die Gesamtproteine des Kälberrippenknorpels.
Inkubationsansatz B s. 2.5.

3.3.3.1. Absättigungsversuche

Das mit rohem CSP abgesättigte Antiserum gegen rohes CSP hat nach zwei Stunden Vorinkubation keinen Einfluß auf den Einbau radioaktiver Precursor in die Chondroitinsulfatpeptide (s. Tab. 11a, 11b). Die Gesamtproteineinbauhemmung ist für ^3H -Leucin und ^{14}C -Serin geringer im Vergleich zur Originalantiserumhemmung (s. Tab. 12), jedoch ist der Gesamtproteineinbau gegenüber Kontrollen noch signifikant vermindert (um 37 % bzw. 20 %).

3.3.4. Der Einfluß von Anti-Proteoglycan-Seren auf die anaerobe Glycolyse von Kälberrippenknorpelzellen in vitro

Das Antiserum gegen rohes CSP erhöht nach Tab. 13 die anaerobe Glycolyserate nach den ersten drei (Vor-)Inkubationsstunden signifikant um 15 bis 30 %; nach der vierten und fünften Stunde wird eine nicht signifikante geringgradige Verminderung und nach sechs Stunden eine nicht signifikante Erhöhung beobachtet. Wird dieses Antiserum mit rohem CSP abgesättigt, vermindert es die anaerobe Glycolyserate nach der ersten und zweiten Stunde nicht signifikant um etwa 15 %, nach der dritten Stunde signifikant um 20 % und nach der vierten Stunde um 10 %.

Das Antiserum gegen reines CSP und das Antiserum gegen PGS haben nach den ersten vier Vorinkubationsstunden keinen Einfluß auf die anaerobe Glycolyserate. Nach den letzten beiden Stunden bewirken sie teilweise signifikante Erhöhungen, das Antiserum gegen reines CSP um 25 %, das Antiserum gegen PGS um 30 % bzw. 40 % (Tab. 13).

Anaerobe Glycolyserate ($\mu\text{Mol CO}_2 \times \text{h}^{-1} \times \text{g}^{-1} \text{FG}$)						
	1. Stunde Inkubation	2. Stunde Inkubation	3. Stunde Inkubation	4. Stunde Inkubation	5. Stunde Inkubation	6. Stunde Inkubation
Normalserum	2,114 $\pm$ 0,506	2,263 $\pm$ 0,471	2,221 $\pm$ 0,516	2,169 $\pm$ 0,519	2,235 $\pm$ 0,434	2,357 $\pm$ 0,750
n = 10 bis 38	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Antiserum gegen rohes CSP	2,728 $\pm$ 0,824	2,603 $\pm$ 0,537	2,654 $\pm$ 0,787	1,935 $\pm$ 0,453	1,918 $\pm$ 0,392	2,718 $\pm$ 1,187
n = 6 bis 18	1,29 p 0,02	1,15 p 0,025	1,19 p 0,025	0,89	0,86	1,15
abgesättigtes Antiserum gegen rohes CSP	1,753 $\pm$ 0,536	2,017 $\pm$ 0,250	1,746 $\pm$ 0,163	2,006 $\pm$ 0,608	-	-
n = 6	0,83	0,89	0,79 p 0,025	0,92		
Antiserum gegen reines CSP	2,050 $\pm$ 0,572	2,418 $\pm$ 0,444	2,215 $\pm$ 0,526	2,156 $\pm$ 0,444	2,329 $\pm$ 0,772	2,943 $\pm$ 1,019
n = 4 bis 12	0,97	1,07	1,00	0,99	1,04	1,25
Antiserum gegen PGS	2,230 $\pm$ 0,531	2,124 $\pm$ 0,364	1,990 $\pm$ 0,548	2,222 $\pm$ 0,237	2,853 $\pm$ 0,171	3,325 $\pm$ 0,401
n = 4 bis 12	1,05	0,94	0,90	1,02	1,28 p 0,05	1,41

Tab. 13: Die Wirkung drei verschiedener Antisera gegen Chondroitinsulfatproteine auf die anaerobe Glycolyserate der Kälberrippenknorpelzellen in vitro während zunehmender Inkubationszeit bei 37°C. Inkubationsansatz B s. 2.5.

3.3.5. Der Einfluß von Antiserum auf Carbazol-positives Material im Inkubationsmedium

Der Gehalt an Carbazol-positivem Material im Inkubationsmedium wurde in Tab. 14 gemessen. Es werden bei z.T. stark streuenden Werten keine signifikanten Unterschiede der Konzentration von Carbazol-positivem Material im Medium bei Verwendung von Normalserum und Antiserum gefunden. Auffallend sind die deutlich niedrigeren Werte bei 1°C Vorinkubation im Vergleich zu denjenigen bei 37°C Vorinkubation.

3.4. Der Einfluß von Hyaluronidasebehandlung auf die Biosynthese von Chondroitinsulfatprotein und Gesamtprotein im Kälberrippenknorpel in vitro

Unterschiedlich lange Hyaluronidasebehandlung hemmt den Einbau radioaktiv markierter Vorstufen in den Sulfopoly-saccharid- und Peptidanteil der durch CPC-Fällung isolierten Chondroitinsulfatpeptide (Tab. 15a) signifikant gegenüber Kontrollen. Nach einer Vorinkubation von 20 min, 70 min und 140 min bei 37°C werden 95 bis 99 % weniger ^{35}S -Sulfat eingebaut im Vergleich zu Kontrollen. Die Inkorporation von ^3H -Leucin ist mit 50 %, 70 % und 15 % weniger stark vermindert.

Wegen der geringen Einbaurrate in das CPC-Alkohol-gefällte Produkt wurde nach Dialyse auch das nicht fällbare Produkt untersucht (Tab. 15b): Auch hier ergeben sich deutliche Einbauhemmungen im Vergleich zu Kontrollen. Hyaluronidasebehandlung bewirkt hoch signifikante Einbauhemmungen von ^3H -Leucin in die Gesamtproteinfraktion des Kälberrippenknorpels. Nach 20 min Vorinkubation werden 90 %, nach 70 min und 140 min 95 % weniger ^3H -Leucin eingebaut im Vergleich zu Kontrollen (bezogen auf mg Protein, g Feuchtgewicht und DNS) (Tab. 16).

Vorinkubation	μ Mol Carbazol-positives Material pro 3 ml Medium		
	Normalserum n = 3 bis 11	Antiserum gegen PGS n = 2 bis 4	Antiserum gegen rohes CSP n = 2 bis 7
1,5 Stunden bei 10°C	0,29±0,16 1,00	0,16±0,13 0,55	-
4,5 Stunden bei 10°C	0,59±0,25 1,00	0,34±0,07 0,58	-
1 Stunde bei 37°C	2,75±0,68 1,00	3,37±0,62 1,23	3,91±0,21 1,42
2 Stunden bei 37°C	3,65±0,74 1,00	3,77±1,17 1,03	3,94±0,57 1,08
4 Stunden bei 37°C	3,84±1,04 1,00	3,32±0,78 0,86	4,14±0,74 1,08

Tab. 14: Der Einfluß von Antiserum gegen PGS und rohes CSP auf Carbazol-positives Material im Inkubationsmedium, Bezugsgröße: Glucuronsäurelacton.

Vorinkubat. bei 37°C	Sulfopolysaccharidanteil			Peptidanteil		
	$^{35}\text{SO}_4$ dpm/ SO_4^{2-+} 1g FG	dpm/1g FG	dpm/100µg DNS	^3H - Leucin dpm/Glc.S. ⁺ 1g FG	dpm/1g FG	dpm/100µg DNS
Kontrollen	3.21 $\pm$ 1.42 $\pm$ 1,00 n=3	246.06 $\pm$ 77.300 1,00 n=3	89.83 $\pm$ 36.190 1,00 n=3	270 $\pm$ 150 1,00 n=3	22.520 $\pm$ 7.000 1,00 n=3	8.830 $\pm$ 2.750 1,00 n=3
20 Min.						
Hyaluronidase	55 $\pm$ 43 p<0,05 0,02 n=2	1.370 $\pm$ 950 p<0,025 0,01 n=3	540 $\pm$ 370 p<0,05 0,01 n=2	138 $\pm$ 170 0,51 n=2	410 $\pm$ 380 p<0,025 0,02 n=2	160 $\pm$ 150 p<0,025 0,02 n=2
Kontrollen	4.640 $\pm$ 1.050 1,00 n=2	319.090 $\pm$ 14.720 1,00 n=2	125.130 $\pm$ 5.770 1,00 n=2	550 $\pm$ 8,5 1,00 n=2	40.120 $\pm$ 4.390 1,00 n=2	15.740 $\pm$ 1.720 1,00 n=2
70 Min.						
Hyaluronidase	48 $\pm$ 12 p<0,025 0,01 n=2	510 $\pm$ 230 p<0,001 0,001 n=2	200 $\pm$ 88 p<0,001 0,001 n=2	145 $\pm$ 57 p<0,01 0,26 n=2	60 $\pm$ 13 p<0,005 0,001 n=2	24 $\pm$ 4,9 p<0,005 0,002 n=2
Kontrollen	4.830 $\pm$ 17 1,00 n=2	333.900 $\pm$ 48.340 1,00 n=2	130.940 $\pm$ 18.960 1,00 n=2	590 $\pm$ 49 1,00 n=2	35.560 $\pm$ 1.570 1,00 n=2	13.950 $\pm$ 610 1,00 n=2
140 Min.						
Hyaluronidase	260 $\pm$ 260 p<0,001 0,05 n=2	490 $\pm$ 290 p<0,01 0,001 n=2	194 $\pm$ 120 p<0,01 0,001 n=2	200 $\pm$ 240 0,85 n=2	138 $\pm$ 46 p<0,001 0,004 n=2	54 $\pm$ 18 p<0,001 0,004 n=2

Tab. 15 a: Der Einfluss von Hyaluronidase-Behandlung auf die Biosynthese von Chondroitinsulfatprotein im Rippenknorpel vom Kalb: CPC-Alkohol-gefälltes Produkt.

+ pro µMol

Vorinkubat. bei 37°C	Sulfopolysaccharidanteil				Peptidanteil			
	dpm/ μ Mol SO_4^{2-}	dpm/1g FG	dpm/100 μ g DNS	dpm/ μ Mol Glc.S.	^3H -Leucin	dpm/1g FG	dpm/100 μ g DNS	
Kontrollen	10.020 $\pm$ 2.520 1,00 n=2	105.390 $\pm$ 39.530 1,00 n=2	41.330 $\pm$ 15.500 1,00 n=2	26.120 $\pm$ 1.670 1,00 n=2	271.410 $\pm$ 52.370 1,00 n=2	106.440 $\pm$ 20.540 1,00 n=2		
20 Min.								
Hyaluroni- dase	1.110 $\pm$ 210 p < 0,05 0,11 n=2	24.200 $\pm$ 71 0,23 n=2	9.520 $\pm$ 28 0,23 n=2	880 $\pm$ 82 p < 0,005 0,03 n=2	19.690 $\pm$ 5.430 p < 0,002 0,07 n=2	7.720 $\pm$ 2.130 p < 0,002 0,07 n=2		
Kontrollen	12.340 $\pm$ 350 1,00 n=2	166.710 $\pm$ 16.960 1,00 n=2	65.380 $\pm$ 6.650 1,00 n=2	37.760 $\pm$ 5.960 1,00 n=2	512.720 $\pm$ 117.880 1,00 n=2	201.070 $\pm$ 46.230 1,00 n=2		
70 Min.								
Hyaluroni- dase	1.190 p < 0,025 0,10 n=1	16.450 0,10 n=1	6.450 0,10 n=1	620 0,02 n=1	8.560 0,02 n=1	3.360 0,02 n=1		
Kontrollen	14.870 $\pm$ 4.460 1,00 n=2	115.800 $\pm$ 14.640 1,00 n=2	45.410 $\pm$ 5.740 1,00 n=2	47.360 $\pm$ 6.680 1,00 n=2	374.120 $\pm$ 13.550 1,00 n=2	146.710 $\pm$ 5.310 1,00 n=2		
140 Min.								
Hyaluroni- dase	3.020 $\pm$ 260 p < 0,05 0,20 n=2	46.210 $\pm$ 6.450 p < 0,01 0,40 n=2	18.120 $\pm$ 2.530 p < 0,01 0,40 n=2	2.100 $\pm$ 820 p < 0,01 0,04 n=2	33.810 $\pm$ 19.940 p < 0,005 0,09 n=2	13.260 $\pm$ 7.820 p < 0,005 0,09 n=2		

Tab. 15 b: Der Einfluß von Hyaluronidase-Behandlung auf die Biosynthese von Chondroitinsulfatprotein im Rippenknorpel vom Kalb: CPC-nicht-gefälltes Produkt nach Dialyse. Inkubationsansatz C s. 2.5.

Vorinkubat. bei 37°C	Gesamtprotein: Einbau von ^3H -Leucin			
	dpm/lg FG	dpm/mg Protein	dpm/100 μg DNS	
Kontrollen	3.844.900 $\pm$ 870.140 1,00 n=3	120.200 $\pm$ 15.610 1,00 n=3	1.507.810 $\pm$ 34.120 1,00 n=3	
20 Min.				
Hyaluronidase	328.850 $\pm$ 104.080 p < 0,01 0,09 n=2	12.630 $\pm$ 1.310 p < 0,005 0,11 n=2	128.960 $\pm$ 40.820 p < 0,005 0,10 n=2	
Kontrollen	6.905.390 $\pm$ 16.190 1,00 n=2	222.520 $\pm$ 6.320 1,00 n=2	2.708.000 $\pm$ 241.640 1,00 n=2	
70 Min.				
Hyaluronidase	144.250 $\pm$ 193.920 p < 0,005 0,02 n=2	8.030 $\pm$ 10.980 p < 0,001 0,04 n=2	56.570 $\pm$ 76.050 p < 0,001 0,02 n=2	
Kontrollen	8.419.130 $\pm$ 130.200 1,00 n=2	287.910 $\pm$ 18.830 1,00 n=2	3.330.350 $\pm$ 133.000 1,00 n=2	
140 Min.				
Hyaluronidase	202.110 $\pm$ 16.000 p < 0,001 0,03 n=2	10.800 $\pm$ 1.810 p < 0,005 0,07 n=2	103.960 $\pm$ 6.530 p < 0,005 0,03 n=2	

Tab. 101. Der Einfluss von Hyaluronidase-Behandlung auf die Inkorporation von ^3H -Leucin in die Gesamtproteine des Kalberrippenknorpels.
Inkubationsansatz C S. 2.5.

3.4.1. Der Einfluß von Hyaluronidasebehandlung
auf die anaerobe Glycolyserate in
Knorpelzellen in vitro

Aus Tab. 17 ist ersichtlich, daß Hyaluronidasebehandlung die anaerobe Glycolyse von Knorpelzellen größtenteils signifikant erhöht. Bei 20-, 70- oder 140-minütiger Vorinkubation und anschließender Inkubation für 90 min mit dem Enzym werden in der ersten Stunde 84 bis 120 % höhere Werte, in der zweiten Stunde 45 bis 110 % höhere Werte, in der dritten Stunde bis 27 % höhere Werte und in der vierten Stunde keine höhere anaerobe Glycolyserate gegenüber Kontrollen gemessen.

3.4.2. Der Einfluß von Hyaluronidasebehandlung auf
den Gehalt an Carbazol-positivem Material
im Medium

Unter Hyaluronidasebehandlung nahm der Gehalt an Carbazol-positivem Material im Medium mit zunehmender Inkubationszeit (110, 160, 230 min, Tab. 18) zu und erreichte Werte zwischen 50 und 65 $\mu\text{Mol/lg}$ Feuchtgewicht. Somit lassen sich offensichtlich bis zu 60 % der extrazellulären Proteoglycane mit Testes-Hyaluronidase in Lösung bringen.

Anaerobe Glycolysate ($\mu\text{Mol CO}_2 \times \text{h}^{-1} \times \text{g FG}^{-1}$)				
	1. Stunde	2. Stunde	3. Stunde	4. Stunde
Kontrollen	2,130 $\pm$ 0,479 1,00 n=3	2,576 $\pm$ 0,015 1,00 n=2	-	-
20 Min. Hyaluronidase	4,483 $\pm$ 0,044 2,10 n=2	3,565 $\pm$ 0,108 1,38 n=2	-	-
Kontrollen	1,989 $\pm$ 0,271 1,00 n=2	1,932 $\pm$ 0,063 1,00 n=2	2,155 $\pm$ 0,128 1,00 n=2	-
70 Min. Hyaluronidase	4,380 2,20 n=1	2,735 $\pm$ 0,271 1,41 n=2	2,740 $\pm$ 0,516 1,27 n=2	-
Kontrollen	2,297 $\pm$ 0,099 1,00 n=2	1,232 $\pm$ 0,297 1,00 n=2	2,956 1,00 n=1	1,604 $\pm$ 0,435 1,00 n=2
140 Min. Hyaluronidase	4,058 $\pm$ 0,124 1,77 n=2	2,551 $\pm$ 0,085 2,07 n=2	3,118 $\pm$ 0,223 1,05 n=2	1,694 1,06 n=2

Tab. 17: Der Einfluß von Hyaluronidase-Behandlung auf die anaerobe Glycolysate in Kälberrippenknorpel in vitro.
Inkubationsansatz C s. 2.5.

μ Mol Carbazol-positives Material/4ml Medium
bei zunehmender Vorinkubation bei 37°C

	20 Minuten	70 Minuten	140 Minuten
Kontrollen	2,75 $\pm$ 0,32	4,54 $\pm$ 0,13	4,65 $\pm$ 0,28
n=2 bis 3	1,00	1,00	1,00
Hyaluronidase	13,64 $\pm$ 0,75	26,50 $\pm$ 2,82	28,73 $\pm$ 0,19
n=2	4,96	5,84	6,18

Tabelle 18: Der Einfluß von Hyaluronidasebehandlung auf den Gehalt an Carbazol-positivem Material, bezogen auf Glucuronsäure im Inkubations-Medium.
Inkubationsansatz A s. 2.5.

4. D i s k u s s i o n

4.1. Der Einfluß von Anti-Proteoglycan-Seren auf die Biosynthese von Chondroitinsulfatprotein, Gesamtprotein und anaerobe Glycolyse in Kälberrippenknorpel in vitro

In rheumatoiden Geweben wurde eine erhöhte anaerobe (und aerobe) Glycolyse beobachtet (3, 10) bei einer gleichzeitig (jedoch) gesteigerten Proteoglycanbiosynthese (5, 22). Weiterhin läßt sich mittels Chondroitinsulfatproteininjektionen eine experimentelle Arthritis erzeugen (7). Obwohl im Serum von Rheuma-Patienten sich bis heute keine präzipitierenden Antikörper gegen Proteoglycan nachweisen ließen (11), wurde in dieser Arbeit der Einfluß von Antiseren gegen verschieden gereinigte Chondroitinsulfatproteine auf die anaerobe Glycolysate und die Biosynthese von Chondroitinsulfatprotein sowie von Gesamtprotein in Kälberknorpelschnitten in vitro untersucht. Dieses semi-in-vitro-System synthetisiert, wie hier und bereits früher gezeigt worden ist, hauptsächlich (90 %) Chondroitinsulfatprotein unter anaeroben in-vitro-Bedingungen (13, 14) und kaum hydroxyliertes Collagen (20). Es sollte die Möglichkeit untersucht werden, ob dieses semi-in-vitro-System als Modellsystem in der Rheumaforschung brauchbar sein könnte.

In Antiseren gegen Chondroitinsulfatproteine müssen wenigstens zwei Typen von Antikörpern diskutiert werden, die gegen verschiedene Teile des Proteincores gerichtet sind: Ein Antikörper, der gegen interspezies-spezifische Determinanten einer kurzen Aminosäuresequenz ("doublets") (vgl. 18) des Cores gerichtet ist, ein anderer mit spezies-spezifischen Antideterminanten gegen andere längere Teile des Proteincores

bzw. gegen die Glycoprotein-"links"-Fraktion (vgl. 12). Im Ouchterlony-Test dürften die ersten Antikörper hauptsächlich schnell wandernde, kleine Chondroitinsulfatproteine (oder Teile davon) präzipitieren, die letzteren langsam wandernde größere Chondroitinsulfatproteine, von denen es offensichtlich zwei verschiedene Formen (s. Tab. 1) gibt. Die Glycoprotein-"link"-Fraktionen scheinen verschieden schnell zu wandern (12) und wurden hier nicht weiter analysiert.

In meiner Arbeit wurde der Einfluß von drei verschiedenartigen Antiseren auf die Chondroitinsulfatbiosynthese untersucht:

- 1.) Antiserum gegen Proteoglycanuntereinheit mit einer langsam wandernden Präzipitationslinie (s. Tab. 1),
- 2.) Antiserum gegen gereinigtes Chondroitinsulfatprotein mit einer schnell und einer langsam wandernden Präzipitationslinie (s. Tab. 1),
- 3.) Antiserum gegen rohes Chondroitinsulfatprotein mit einer schnell, zwei langsamer und einer langsam wandernden Präzipitationslinie (s. Tab. 1).

Von den drei untersuchten Antiseren entwickelte dasjenige gegen rohes Chondroitinsulfatprotein gerichtete die stärksten Hemmwirkungen sowohl auf die Biosynthese von Chondroitinsulfatprotein als auch von Gesamtprotein. Dieser stark ausgeprägten Inhibierung läuft gleichzeitig eine signifikant erhöhte anaerobe Glycolyserate parallel, die bei den anderen beiden untersuchten Antiseren gegen reines Chondroitinsulfatprotein und die Proteoglycansubunit nicht oder nur geringgradiger gefunden wurde.

Bei der Frage nach der Entwicklung der Hemmwirkung kann festgestellt werden, daß diese nach einer Stunde Präinkubation geringgradig, am höchsten nach zwei Stunden ausgeprägt ist (bei gleichzeitig erhöhter anaerober Glycolyserate), um nach vier Stunden Präinkubation bereits an Ausmaß wieder zu verlieren. Da während der gesamten Prä- und Inkubationszeit die anaerobe Glycolyserate linear mit der Zeit ansteigt, dürften die untersuchten Knorpelzellen noch einen intakten Stoffwechsel aufweisen. Auch dürfte die Knorpelmatrix durch das Einwirken dieser Antiseren nicht in Lösung gehen, was der über die ganze Inkubationszeit gemessene unveränderte Gehalt an Carbazol-positivem Material im Inkubationsmedium anzeigen dürfte. Allerdings schwanken die Meßergebnisse stark (s. Tab. 14).

Aus den prozentual gegenüber jeweiligen Kontrollen berechneten Einbauhemmraten der Sulfatierung und der Kettenverlängerung des Chondroitinsulfatpeptids ergibt sich eine stärkere Inhibierung im Vergleich zur Markierung des Peptidanteils (^3H -Leucin- und ^{14}C -Serineinbau); letztere ist allerdings im Chondroitinsulfatpeptid weniger stark gehemmt als der Gesamtproteineinbau. Da frühere Untersuchungen gezeigt haben, daß bei der Chondroitinsulfatproteinbiosynthese in ganzen Knorpelzellen eine Rückkopplung zwischen Sulfatierung und Kettenverlängerung einerseits besteht, sowie zwischen Seitenkettenbildung und Chondroitinsulfat-Bindungsregionsynthese (gal gal-xyl-ser) andererseits (14, 21), kann aus den hier beobachteten Einbauhemmungen durch das Antiserum gegen rohes Chondroitinsulfatprotein auf eine Inhibierung sowohl der Chondroitinsulfatseitenkettenbildung geschlossen werden als auch auf eine Hemmung der gesamten Proteinsynthesefabrik. Ob diese Inhibierung auf eine veränderte Schaltung im Energiestoffwechsel zurückgeführt werden kann (Erhöhung der anaeroben Glycolyse), muß hier offen bleiben.

Hervorgehoben werden muß, daß mit den beiden anderen untersuchten Antiseren gegen reines CSP und PGS keine oder nur geringgradige Hemmungen der Chondroitinsulfatproteinbiosynthese beobachtet wurde bei einem zum Teil stark gehemmten Gesamtproteineinbau. Inwiefern diese unterschiedliche Wirkung auf verschiedenartige Antikörper zurückzuführen ist, muß hier offen bleiben.

Da nach Absorption der spezifischen Antikörper im Antiserum gegen rohes Chondroitinsulfatprotein durch Zugabe von rohem Chondroitinsulfatprotein die Hemmwirkung auf die Chondroitinsulfatproteinbiosynthese erlischt, diejenige der Gesamtproteine wird nur etwas vermindert und bleibt somit teilweise bestehen, müssen noch andere unbekannte Hemmfaktoren diskutiert werden, z.B. Glucocorticoide (8) und andere im Serum vorkommende Hormone (6, 23). Diese Hemmwirkungen konnten allerdings in Kontrollseren nicht nachgewiesen werden.

4.2. Der Einfluß von Hyaluronidaseabbau der Knorpel-
grundsubstanz mittels Hyaluronidase auf die
Biosynthese von Chondroitinsulfatprotein,
Gesamtprotein und anaerobe Glycolyse in
Kälberrippenknorpel in vitro

Um den Inhibitoreffekt des Antiserums gegen Chondroitinsulfatprotein weiter zu charakterisieren, wurde die unmittelbare Wirkung von Hyaluronidaseabbau der Knorpelextrazellulärschicht auf die Biosynthese von Chondroitinsulfatprotein und Gesamtprotein von Knorpelzellen untersucht. Überraschenderweise ergibt sich auch hier eine Steigerung der anaeroben Glycolyse linear mit zunehmender Vor- und Inkubation ansteigend bei einer stark verminderten Chondroitinsulfatproteinbiosynthese sowie Gesamtproteinmarkierung (15). Diese

Beobachtung wurde ebenfalls von SOLURSK und KARP beschrieben (25). Inwieweit diese Hemmwirkung auf durch Hyaluronidase freigesetzte Abbauprodukte zurückzuführen ist (vgl. 27), muß hier offen bleiben.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß sowohl die Behandlung von Knorpelzellen mit Antiserum gegen rohes Chondroitinsulfatprotein als auch der Abbau von Extrazellulärsubstanz mittels Hyaluronidase ähnliche Wirkungen auf die Chondroitinsulfatproteinbiosynthese und Gesamteinproteinbiosynthese von Knorpelzellen *in vitro* aufweisen. Weitere Untersuchungen sind jedoch noch notwendig, um diese Befunde zu untermauern und mit solchen in rheumatischen Geweben zu korrelieren.

5. Zusammenfassung

Die Wirkung von Antiserum gegen A) rohes Chondroitinsulfatprotein (4 Präzipitationslinien gegen sein Antigen), gegen B) gereinigtes Chondroitinsulfatprotein (2 Präzipitationslinien) und gegen C) gereinigte Proteoglycanuntereinheit (1 Präzipitationslinie) aus Kälberrippenknorpel wird in einem semi-in-vitro-System aus Kälberrippenknorpel untersucht, welches unter anaeroben Bedingungen überwiegend Chondroitinsulfatprotein synthetisiert und kaum Collagen.

Während zunehmender Präinkubationszeiten (1, 2, 4 Stunden) bei 37°C mit anschließender Inkubation mit radioaktiven Vorstufen der Chondroitinsulfatbiosynthese ($^{35}\text{SO}_4^{2-}$, ^3H -Glucosamin, ^{14}C -Serin und ^3H -Leucin) für 1,5 Stunden zeigt Antiserum A den stärksten Effekt: Es erhöht gegenüber Kontrollen signifikant die anaerobe Glycolyserate der Knorpelzellen bei gleichzeitiger signifikanter Einbauhemmung der radioaktiven Vorstufen in das isolierte Chondroitinsulfatpeptid sowie in das Gesamtprotein (Doppelmarkierungsversuche). Die stärkste Inhibierung wird nach zwei Stunden Vorinkubation erhalten.

Aus diesen Ergebnissen werden zwei Angriffspunkte des Antiserums A in der Knorpelzelle abgeleitet:

- a) bei der Bildung der Chondroitinsulfatseitenketten,
- b) im Proteinsyntheseapparat.

Nach Entfernung der spezifischen Antikörper aus Antiserum A mittels Absorption mit seinem Antigen ist der hemmende Effekt nicht mehr nachweisbar (Ausnahme: Gesamtproteinmarkierung) und die anaerobe Glycolyserate gegenüber Kontrollen unauffällig.

Antiseren B und C entwickeln geringere Effekte mit Ausnahme der Hemmung von der Gesamtproteinmarkierung.

Ein in vitro-Abbau der Knorpelgrundsubstanz mit Testes-Hyaluronidase zeigt einen ähnlichen Effekt: Hemmung der Markierung der isolierten Chondroitinsulfatpeptide und der Gesamtproteine bei einer gleichzeitigen Steigerung der anaeroben Glycolyserate.

Die Ergebnisse werden mit biochemischen Veränderungen in rheumatoiden Geweben verglichen und Parallelen aufgezeigt.

6. L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

1. ANTRONCPOULOS,C.A., S.GARDELL, J.A.SZIRMAI and ELLEN R. de TYSSONSK: Determination for glycosaminoglycans (mucopolysaccharides) from tissue on the microgram scale.
Biochem. biophys. Acta 83, 1-19 (1964)
2. BITTER,T. and H.M.MUIR: A modified uronic acid carbazole reaction.
Analytical Biochem. 4, 330-334 (1962)
3. BINZUS,G. in: Rheumatoid arthritis (Müller,W., Harworth, H.G. and Fehr, K., eds.) pp 589-593, Academic Press London, New York (1971)
4. CHRISMAN,O.D., FESSEL,J.M. and SOUTHWICK,W.O.: Experimental production of synovitis and marginal articular exostoses in the knee joints of dogs.
Yale J. Biol. Med. 37, 409-412 (1965)
5. COLLINS,D.H. and T.F.McELLIGOTT: Sulfate ($^{35}\text{SO}_4$) uptake by chondrocytes in relation to histological changes in osteoarthritic human articular cartilage.
Ann. rheum. Dis. 19, 318-330 (1960)
6. DREZNER,M.K., G.S.EISENBARTH, F.A. NEELON and H.E. LEBOVITZ: Stimulation of cartilage amino acid uptake by growth hormone-dependent factors in serum.
Biochem. biophys. Acta 381, 384-396 (1975)
7. EGURO,H. and J.L.GOLDNER: Antigenic properties of chondromucoprotein and inducibility of experimental arthritis by antichondromucoprotein immune globulin.
J. Bone & Joint Surgery 56, 129-141 (1974)

8. EISENBARTH, G.S. and H.E. LEBOWITZ: Isolation and characterization of a serum inhibitor of cartilage metabolism.
Endocrinology 95, 1600-1607 (1974)
9. GEORGE, R.C. and O.D. CHRISMAN: The role of cartilage polysaccharides in osteoarthritis.
Clin. Orthop. 57, 259-265 (1968)
10. GREILING, H., R. KISTERS and G. ENGELS: Die Enzyme der Synovialflüssigkeit und ihre pathologische Bedeutung.
Enzymol. D. Haag 30, 135-146 (1966)
11. HERMAN, J.H., D.W. WILTSE and M.V. DENNIS: Immuno-pathologic significance of cartilage antigenic components in rheumatoid arthritis.
Arthritis and Rheumatism 16, 287-297 (1973)
12. KEISER, H. and J.I. SANDSON: Immunodiffusion and gel-electrophoretic studies of human articular cartilage proteoglycan.
Arthritis and Rheumatism 17, 219-228 (1974)
13. KLEINE, T.O. und H. HILZ: Untersuchungen zur Biosynthese der Chondroitinsulfat-Proteine I. Charakterisierung der Protein-Polysaccharide aus Kälberrippenknorpel und ihre in vitro-Markierung mit $^{35}\text{SO}_4^{2-}$.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, 1027-1036 (1968)
14. KLEINE, T.O., H.J. KIRSIG und H. HILZ: Untersuchungen zur Biosynthese der Chondroitinsulfat-Proteine II. Über die Koordinierung von Protein-, Polysaccharid- und Sulfatester-Synthese im Rippenknorpel von Kälbern.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, 1037-1048 (1968)

15. KLEINE, T.O. and M. WUNSCH: The effect of antiproteoglycan serum and hyaluronidase on metabolic functions of calf cartilage cells in vitro.
Ann. rheum. Dis. 34 Suppl. pp 59-60 (1975)
16. KLEINE, T.O. and M. WUNSCH: Immune-specific influences on the biosynthesis of proteochondroitin sulfate in calf rib cartilage in vitro.
In Druck
17. KLEINE, T.O., H.J. KIRSIG and H. HILZ: On the biosynthesis of chondroitin sulfate protein III. Metabolic and chemical heterogeneity in calf rib cartilage as revealed by CsCl gradient centrifugation and CPC-cellulose chromatography.
Hoppe-Seyler's z.physiol. chem. 352, 479-487 (1971)
18. KLEINE, T.O. in: Connective tissues, biochemistry and pathophysiology.
(Fricke, R. and Hartmann, F. eds.)
pp. 16-36, Springer Berlin (1974)
19. KLEINE, T.O. und F. DAPPER in: Molekulare und zelluläre Aspekte des Altern.
(Platt, D. und Lasch, H.G. eds.)
F.K. Schattauer-Verlag, Stuttgart, 97-102 (1971)
20. KLEINE, T.O.: Differences in pool labeling during proteoglycan and collagen biosynthesis under anaerobic conditions in vitro.
9th Int. Congr. Biochem. Stockholm 1973,
Abstract 1612, p. 1424

21. KLEINE, T.O.: Struktur, Biosynthese und Heterogenität der Chondroitinsulfatproteine.
Naturwissenschaften 59, 64-71 (1972)
22. LINDNER, J. in: Rheumatoid arthritis.
(Müller, W., Harwerth, H.-G. and Fehr, K. eds.)
Academic Press, London, New York (1971)
23. MEIER, S. and M.SOLURSH: The comparative effects of several mammalian growth hormones on sulfate incorporation into acid mucopolysaccharides by cultured chick embryo chondrocytes.
Endocrinology 90, 1447-1451 (1972)
24. SCHNEIDER, W.C. in: Methods in enzymology, vol. III, p. 680, Academic Press, New York (1957)
25. SOLURSH, M. and G.C.KARP: An effect of accumulated matrix on sulfation among cells in a cartilage colony: an autoradiographic study.
J. Exp. Zool. 191, 73-84 (1974)
26. UMBREIT, W.W., R.H.BARRIS and J.F.STAUFFER: Manometric techniques.
Burgess Publishing Company, Minneapolis (1964)
27. WASTESON, A., U.LINDAHL and A.HALLEN: Mode of degradation of the chondroitin sulfate proteoglycan in rat costal cartilage.
Biochem. J. 130, 729-738 (1972)
28. WEICHSELBAUM, T.E. : Amer.J.clin.Path. (Techn.Sect.) 10, 40 (1946)

Verzeichnis meiner akademischen Lehrer:

Amon, Aurich, Castenholz, Dimroth, Engelhardt, Haan,
Hennis, Hering, Heuser, Hort, Hupe, Janke, Karlson,
Koecke, Korb, Kühnel, Niemeyer, Nöth, Öhmig, Petry,
Pfütz, Riecken, Rohen, Rosemann, Rupec, Schiff,
Schmidt, Schmitz-Moormann, Schnell, Walcher.

Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel:

"Der Einfluß von Anti-Proteoglycan-Seren und von Hyaluronidaseabbau der Extracellulärsubstanz auf die Biosynthese von Chondroitinsulfatprotein, Gesamtprotein und anaerobe Glycolyse im Kälberripenknorpel in vitro"

im klinisch-chemischen Labor der Universitäts-Nervenlinik Marburg

unter Leitung von Herrn Prof. Dr. T.O. Kleine ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Fachbereich Humanmedizin ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, den 26.3.1976

Manika Kusch

Lebenslauf

Am 24.12.1948 bin ich in Oberkochen als zweites Kind meiner Vaters Gerhard Fechner und meiner Mutter Ursula Fechner geboren. Nach vierjähriger Volksschulzeit in Oberkochen wechselte ich auf das Progymnasium Oberkochen über, wo ich die sechs Jahre bis zur mittleren Reife verblieb. Am Theodor-Heuss-Gymnasium in Aalen legte ich dann nach weiteren drei Jahren am 20. Juni 1968 die Reifeprüfung ab. Am 22. Oktober 1968 wurde ich in der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Philipps-Universität Marburg immatrikuliert. Nach einem Semester wurde ich in die Medizinische Fakultät, Bereich Zahnheilkunde aufgenommen. Da mir das erste Semester angerechnet wurde, konnte ich am 1.10.1969 die naturwissenschaftliche Vorprüfung ablegen. Am 29.3.1971 bestand ich die zahnärztliche Vorprüfung und am 11.12.1973 die zahnärztliche Prüfung. Die Bestallung als Zahnärztin wurde mir am 3.1.1974 erteilt. Seit dem 1. Juli 1974 bin ich als zahnärztliche Assistentin in freier Praxis tätig. Zur Zeit wohne ich in 33 Braunschweig, Chemnitzstr. 2, meine Heimatadresse lautet: 7082 Oberkochen, Lerchenstr. 15.

